

---

# DIPLOMARBEIT

---

Frau

**Bianca Melzer**

**Transformation von  
*Brachypodium distachyon*  
durch den *Agrobacterium*-  
vermittelten Gentransfer  
in Sprosssegmentkallus**

2011



---

**DIPLOMARBEIT**

---

**Transformation von  
*Brachypodium distachyon*  
durch den *Agrobacterium*-  
vermittelten Gentransfer  
in Sprosssegmentkallus**

Autor:  
**Bianca Melzer**

Studiengang:  
**Umwelttechnik/Biotechnologie**

Seminargruppe:  
**UT06wB1**

Erstprüfer:  
**Prof. Dr. rer. nat. Röbbbe Wünschiers**

Zweitprüfer:  
**Dr. sc. agr. Jochen Kumlehn**

Mittweida, April 2011

## **Bibliographische Angaben:**

Melzer, Bianca:

Transformation von *Brachypodium distachyon* durch den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer in Sprosssegmentkallus. – 2010-2011. – 166 S.

Mittweida, Hochschule Mittweida (FH), University of Applied Sciences,

Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik, Diplomarbeit, 2010-2011

## **Referat**

Das Gras *Brachypodium distachyon*, dessen Kerngenom im Jahre 2008 vollständig sequenziert wurde, ist die neue monokotyle Modellpflanze für die Getreidearten der gemäßigten Breiten und somit für die anwendungsorientierte Pflanzenforschung von größter Bedeutung. Bereits etablierte Regenerations- und Transformationssysteme, die eine grundlegende Voraussetzung für Modellpflanzen darstellen, greifen jedoch bislang auf unreife Embryonen als Explantate für Kalluskulturen zurück und sind somit stets auf Gewächshauskulturen angewiesen. In der vorliegenden Arbeit sollte eine neue Methode zur Induktion und Transformation von Kalluskulturen aus Sprosssegmenten und deren Regeneration zu vollständigen Pflänzchen etabliert und optimiert werden. Des Weiteren befasst sich ein Teil der Arbeit mit dem Versuch ein Binärplasmid zu klonieren, welches der Problemstellung entsprechend anhand eines Fusionsreporterproteins aus GFP und GUS zukünftig den Nachweis von Transformationsereignissen erleichtern sollte.

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	VI
Diagrammverzeichnis .....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abkürzungsverzeichnis .....	XI
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Brachypodium distachyon</i> .....	3
1.2 Pflanzenzellkultur.....	5
1.2.1 Kalluskulturen .....	6
1.2.2 Somatische Embryogenese .....	7
1.2.3 Genetische Transformation .....	9
1.2.4 <i>Agrobacterium</i> -vermittelter Gentransfer .....	10
1.3 Stand der Forschung – <i>B.distachyon</i> Kalluskulturen und genetische Transformation .....	11
1.4 Ziel der Arbeit .....	16
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
2.1 Material .....	18
2.1.1 Pflanzenmaterial und -anzucht .....	18
2.1.2 Oligonukleotide .....	18
2.1.3 Bakterienstämme .....	19
2.1.4 Plasmide .....	19
2.1.5 Medien und Lösungen .....	21
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 Klonierungsarbeiten .....	22
2.2.1.1 Allgemeine Techniken und verwendete Materialien .....	22
Vermehrung der Ausgangs- und Zwischenvektoren .....	22
Isolierung der Plasmid-DNA .....	22
Enzymatische Restriktion von Plasmid-DNA .....	22
Auftrennung von Spaltungsfragmenten mittels Gelelektrophorese .....	22
Eluierung von Plasmidfragmenten aus Agarosegelen .....	23
Ligation der Plasmid-Fragmente .....	23

Plasmidtransfer in elektrokompetente <i>E.coli</i> -Stämme durch Elektroporation.....	23
Sequenzierung der Plasmid-DNA .....	24
Biolistischer Gentransfer in Gerstenembryonen zur Verifikation der Vektorfunktionalität .....	24
2.2.1.2 Klonierungsablauf .....	24
2.2.1.2.1 Erstellung des Zwischenvektors pBM152 .....	27
2.2.1.2.2 Überprüfung der Funktionalität des Zwischenvektors pBM152.....	28
2.2.1.2.3 Erstellung des Binärplasmids pBM279.....	28
2.2.2 Pflanzengewebekultur.....	31
2.2.2.1 Oberflächensterilisation und Keimung .....	31
2.2.2.2 Präparation der Segmente und Kallusinduktion.....	32
2.2.2.3 Regeneration .....	34
2.2.2.4 Identifizierung des regenerierenden Bereiches .....	35
2.2.2.4.1 Visuelle Dokumentation der Kallusentwicklung unterschiedlicher Segmente .....	35
2.2.2.4.2 Abhängigkeit der Kallusinduktion von der Sprosslänge.....	35
2.2.2.4.3 Mikroskopische Untersuchungen.....	35
2.2.3 Gentransfer in Sprosssegmentkallus mittels <i>A.tumefaciens</i> .....	36
2.2.3.1 Agrobakterienanzucht für die Transformation.....	36
2.2.3.2 <i>Agrobacterium</i> -vermittelter Gentransfer.....	36
2.2.3.2.1 Anwendung eines modifizierten Protokolls für unreife Gerstenembryonen (Variante 1).....	37
2.2.3.2.2 Anwendung eines modifizierten Protokolls für unreife <i>B.distachyon</i> - Embryonen (Variante 2a-2c).....	38
Variante 2a .....	38
Variante 2b .....	39
Variante 2c .....	39
2.2.3.2.3 Anwendung eines modifizierten Protokolls für unreife Maisembryonen (Variante 3) .....	40
2.2.3.3 Selektion und Regeneration .....	41
2.2.3.4 Nachweis der GFP-Expression in den regenerierten Pflänzchen .....	41
2.2.4 Molekularbiologische Arbeiten .....	42

2.2.4.1	Nachweis der Hygromycinresistenz in Blattsegmenten (HYG-Test) .....	42
2.2.4.2	Histochemischer Nachweis der <i>gus</i> -Expression (GUS-Assay).....	43
2.2.4.3	Isolierung genomischer DNA .....	43
2.2.4.4	Polymerase-Kettenreaktion und Gelelektrophorese .....	44
2.2.4.5	DNA-Gel-Blot-Analyse .....	45
2.2.4.5.1	Digoxigenin (DIG)–Sonden Synthese .....	45
2.2.4.5.2	Restriktion genomischer DNA mit <i>HinDIII</i> und gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente .....	46
2.2.4.5.3	Immobilisation aufgetrennter genomischer DNA auf einer Membran .....	48
2.2.4.5.4	Hybridisierung einer genspezifischen DNA-Sonde mit genomischer DNA .....	48
2.2.4.5.5	Nachweis der Hybridisierung .....	49
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>50</b>
3.1	Klonierungsarbeiten .....	50
3.2	Pflanzengewebekultur .....	53
3.2.1	Oberflächensterilisation und Keimung .....	53
3.2.2	Kallusinduktion und Regeneration .....	56
3.2.2.1	Reproduktion der Kallusinduktion und Regeneration .....	58
3.2.2.2	Einfluss der 2,4-D-Konzentration im Kallusinduktionsmedium .....	59
3.2.2.3	Einfluss der BAP-Konzentration im Kallusinduktionsmedium.....	61
3.2.2.4	Einfluss zusätzlicher Stickstoffquellen im Kallusinduktionsmedium .....	62
3.2.2.5	Einfluss von CuSO <sub>4</sub> im Kallusinduktionsmedium .....	63
3.2.2.6	Einfluss der Art der Kohlenstoffquelle im Kallusinduktionsmedium .....	64
3.2.2.7	Einfluss der Explantatgröße .....	66
3.2.2.8	Einfluss der Keimung mit Spelze auf die Kallusinduktion ....	68
3.2.3	Identifizierung des embryogenen Kallus-bildenden Sprossbe- reiches .....	70
3.2.3.1	Visuelle Dokumentation der Kallusentwicklung unterschiedlicher Segmente .....	70
3.2.3.2	Abhängigkeit der Kallusinduktion von der Sprosslänge .....	77

3.2.3.3	Mikroskopische Untersuchungen.....	79
3.3	Gentransfer in Sprosssegmentkallus mittels <i>A.tumefaciens</i> .....	83
3.3.1	Anwendung eines modifizierten Protokolls für unreife Gerstenembryonen (Variante 1).....	83
3.3.2	Anwendung eines modifizierten Protokolls für unreife <i>B.distachyon</i> - Embryonen (Variante 2a-2c).....	84
	Variante 2a .....	84
	Variante 2b.....	85
	Variante 2c .....	86
3.3.3	Anwendung eines modifizierten Protokolls für unreife Maisembryonen (Variante 3) .....	88
3.4	Molekularbiologische Arbeiten .....	90
3.4.1	Nachweis der Hygromycinresistenz in Blattsegmenten (HYG-Test) .....	90
3.4.2	Histochemischer Nachweis der <i>gus</i> -Expression (GUS-Assay) ...	91
3.4.3	Nachweis des <i>HPT</i> -Gens mittels PCR und Gelelektrophorese....	91
3.4.4	DNA-Gel-Blot-Analyse .....	93
3.4.5	Gegenüberstellung der Nachweisergebnisse.....	94
<b>4</b>	<b>Diskussion und Ausblick .....</b>	<b>95</b>
4.1	Klonierung .....	95
4.2	Pflanzengewebekultur.....	98
4.2.1	Oberflächensterilisation und Keimung .....	98
4.2.2	Kallusinduktion und Regeneration .....	98
4.2.2.1	Reproduktion der Kallusinduktion und Regeneration.....	99
4.2.2.2	Einfluss der 2,4-D-Konzentration im Kallusinduktionsmedium .....	100
4.2.2.3	Einfluss der BAP-Konzentration im Kallusinduktionsmedium .....	101
4.2.2.4	Einfluss zusätzlicher Stickstoffquellen im Kallusinduktionsmedium .....	102
4.2.2.5	Einfluss von CuSO <sub>4</sub> im Kallusinduktionsmedium.....	103
4.2.2.6	Einfluss der Art der Kohlenstoffquelle im Kallusinduktionsmedium .....	104
4.2.2.7	Einfluss der Explantatgröße .....	105
4.2.2.8	Einfluss der Keimung mit Spelze auf die Kallusinduktion ...	106



4.2.3	Identifizierung des embryogenen Kallus-bildenden Sprossbereiches .....	108
4.2.4	Schlussfolgerung .....	111
4.3	Gentransfer in Sprosssegmentkallus mittels <i>A.tumefaciens</i> .....	112
4.3.1	Vergleich der Transformationsvarianten .....	112
4.3.2	Schlussfolgerung .....	117
4.4	Molekularbiologische Nachweise .....	118
4.4.1	Transgenität der T <sub>0</sub> -Generationen und generative Vererbung von Transformationsereignissen.....	118
4.4.2	Schlussfolgerung .....	121
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>122</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>XIV</b>
	<b>Medien und Lösungen.....</b>	<b>XIV</b>
	Medien für die Klonierungsarbeiten .....	XIV
	Medien für Pflanzengewebekultur .....	XV
	Medien für den <i>Agrobacterium</i> -vermittelten Gentransfer .....	XVII
	Lösungen für molekularbiologische Arbeiten .....	XX
	<b>Chemikalien .....</b>	<b>XXIII</b>
	<b>Geräte .....</b>	<b>XXVI</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>XXVIII</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>XXXVI</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>XXXVII</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>B.distachyon</i> Linie Bd21-3 .....	4
Abbildung 2: Prinzipielle Methoden der klonalen Vermehrung von Pflanzen (Mikropropagation) .....	5
Abbildung 3: verwendeter Sequenzabschnitt des Vektors pGH129-2 von G. Hensel .....	19
Abbildung 4: verwendeter Sequenzabschnitt des Vektors pUbi-AB-M .....	20
Abbildung 5: T-DNA des Vektors p6int-Ubi .....	20
Abbildung 6: T-DNA Sequenz des Binärvektors pGH215 von G. Hensel.....	21
Abbildung 7: Klonierungsplan zur Erstellung des Zwischenvektors pBM152.....	25
Abbildung 8: Klonierungsplan zur Erstellung des Binärplasmids pBM279 .....	26
Abbildung 9: Restriktionsfragmente von pGH129 und pUbi-AB-M mit Gelelektrophorese aufgetrennt.....	27
Abbildung 10: Restriktionsansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt.....	29
Abbildung 11: Eluat der ausgeschnittenen Fragmente (Abbildung 10) mit Gelelektrophorese aufgetrennt.....	30
Abbildung 12: schematischer Versuchsaufbau für die Kallusinduktion.....	32
Abbildung 13: abgelöster Spross mit Schnittprofil der verschiedenen Explantatgrößen.....	33
Abbildung 14: Ablaufplan Transformationsvariante 1 .....	37
Abbildung 15: Ablaufplan Transformationsvariante 2a .....	38
Abbildung 16: Ablaufplan Transformationsvariante 3 .....	40
Abbildung 17: T-DNAs des Binärvektors pTwin GUS+HPT:GFP .....	42
Abbildung 18: TurboBlotter-Aufbau nach Whatman (Whatman, 2009).....	48
Abbildung 19: Kontrollrestriktion der Plasmid-DNA von pBM152 mit <i>EcoRV</i> ..	50

Abbildung 20: GFP- und GUS-Nachweis in Gerstenembryonen .....	51
Abbildung 21: Vergleich der Keimraten nach 4 min OS mit 6% NaOCl. ....	55
Abbildung 22: Schematischer Versuchsablauf für die Optimierung der Kallusinduktion .....	56
Abbildung 23: Kallusinduktion und Regeneration von <i>B.distachyon</i> aus Sprosssegmenten .....	58
Abbildung 24: Kallusentwicklung und Regeneration der ca. 0,3 – 0,5 mm dünnen Segmente von einem Spross (1mal) .....	71
Abbildung 25: Kallusentwicklung und Regeneration der ca. 2 – 3 mm langen, eingeschnittenen Segmente von einem Spross (2mal) .....	74
Abbildung 26: Kallusentwicklung und Regeneration ganzer, eingeschnittener Sprosse (Spitze entfernt) .....	76
Abbildung 27: Sprosslängsschnitt von <i>B.distachyon</i> .....	79
Abbildung 28: Segmente mit Kallusentwicklung nach sieben Tagen Kallusinduktion .....	80
Abbildung 29: Segmente mit Epidermisgewebe nach sieben Tagen Kallusinduktion .....	81
Abbildung 30: Segment mit totem Gewebe nach sieben Tagen Kallusinduktion.	81
Abbildung 31: GFP-Nachweis im regenerierenden Kallus aus Transformationsvariante 1 (mit Pilzbefall) .....	84
Abbildung 32: GFP-Nachweis in somatischen Embryonen eines Kallus aus Transformationsvariante 2b .....	85
Abbildung 33: GFP-Nachweis in regenerierendem Kallus aus Transformationsvariante 2c .....	86
Abbildung 34: GFP-Nachweis in der Frischblattprobe eines Regenerates aus Variante 2c .....	87
Abbildung 35: GFP-Nachweis in Kalli aus Transformationsvariante 3 .....	88
Abbildung 36: Nachweis von HPT mittels Hygromycin-Blatttest .....	91

Abbildung 37: Nachweis des mit PCR amplifizierten <i>HPT</i> -Sequenzfragmentes (707 bp) mittels gelelektrophoretischer Auftrennung.....	92
--	----

Abbildung 38: Southern-Blot Analyse der T <sub>1</sub> Generation.....	93
--	----

## Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: PCR-Programm des Thermocyclers für die Amplifikation des <i>HPT</i> -Gens.....	45
--	----

Diagramm 2 PCR-Programm des Thermocyclers für die DIG-Sonden-Synthese	46
---	----

Diagramm 3: Prozentuale Rate an ausgekeimten und kontaminierten Körnern bei unterschiedlichen Oberflächensterilisationsmethoden .....	54
---	----

Diagramm 4: Effekt des synthetischen Auxinanalogs 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure.....	60
---	----

Diagramm 5: Effekt des Cytokinins 6-Benzylaminopurin .....	61
--	----

Diagramm 6: Effekt einer zusätzlichen Stickstoffquelle in Form von Glutamin oder NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	62
--	----

Diagramm 7: Effekt von CuSO <sub>4</sub> .....	63
--	----

Diagramm 8: Effekt von Saccharose .....	65
---	----

Diagramm 9: Effekt unterschiedlicher Segmentlängen .....	66
--	----

Diagramm 10: prozentuale Verteilung der Anzahl an Segmenten pro Spross die rK gebildet haben.....	67
---	----

Diagramm 11: Effekt der Keimung mit Spelze .....	69
--	----

Diagramm 12: Position der embryogenen Kallus bildenden Segmente in Abhängigkeit der Länge des jeweils verarbeiteten Sprosses.....	78
---	----

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Oligonukleotide mit Basensequenz .....	18
Tabelle 2: Oberflächensterilisationsvarianten .....	31
Tabelle 3: Medienvarianten und -wechsel während der Kallusinduktion (KI) .....	33
Tabelle 4 PCR-Mix .....	44
Tabelle 5: PCR-Ansatz für DIG-Sonden Synthese mit „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ von Roche (D) .....	45
Tabelle 6: Restriktionsansatz für genomische DNA .....	47
Tabelle 7: Restriktionsansatz für Plasmidkontrolle.....	47
Tabelle 8: Ausbeute der Kallusinduktion auf CIM <sub>B</sub> (11) und CIM <sub>B</sub> (22) .....	59
Tabelle 9: Zusammenfassung der Testergebnisse aus 3.4 ohne GUS-Assay. ....	94
Tabelle 10: LB-Flüssigmedium.....	XIV
Tabelle 11: LB-Festmedium.....	XIV
Tabelle 12: <i>super optimal broth with catabolic repressor (SOC)</i> -Medium .....	XIV
Tabelle 13: Keimmedium .....	XV
Tabelle 14: CIM <sub>B</sub> (11)-Kallusinduktionsmedium .....	XV
Tabelle 15: K4N-Regenerationsmedium (Kumlehn <i>et al.</i> , 2006) .....	XVI
Tabelle 16: K4- Makro und Mikro Minerale (Kumlehn <i>et al.</i> , 2006) .....	XVI
Tabelle 17: MG/L Bakterienmedium (Garfinkel und Nester, 1980) .....	XVII
Tabelle 18: CIM <sub>B</sub> (11)-Co-Kulturmedium .....	XVII
Tabelle 19: CIM <sub>B</sub> (11)-Selektionsmedium.....	XVII
Tabelle 20: Gersten-Inokulationsmedium (Hensel <i>et al.</i> , 2009) .....	XVIII
Tabelle 21: Mais-Infektionslösung (Hensel <i>et al.</i> , 2009).....	XVIII

Tabelle 22: Mais-Co-Kulturmedium (Hensel <i>et al.</i> , 2009).....	XVIII
Tabelle 23: K4N-Regenerationsmedium mit Selektion.....	XIX
Tabelle 24: MS-Flüssigmedium für HYG-Blatttest.....	XX
Tabelle 25: X-Gluc-Lösung für GUS-Assay .....	XX
Tabelle 26: DNA-Extraktionspuffer .....	XX
Tabelle 27: TRIS-EDTA-Puffer mit RNase.....	XXI
Tabelle 28: TRIS-Borat-EDTA-Puffer.....	XXI
Tabelle 29: Blaumarker .....	XXI
Tabelle 30: Denaturierungspuffer .....	XXI
Tabelle 31: Neutralisationspuffer .....	XXI
Tabelle 32: 20 x salziges Natrium Citrat .....	XXII
Tabelle 33: Maleinsäurepuffer .....	XXII
Tabelle 34: Detektionspuffer .....	XXII
Tabelle 35: Waschpuffer .....	XXII
Tabelle 36: 20% Natriumdodecylsulfat .....	XXII
Tabelle 37: Chemikalienliste .....	XXIII
Tabelle 38: Geräteliste .....	XXVI

## Abkürzungsverzeichnis

$\Delta\bar{x}$	Standardabweichung des Mittelwertes
2,4-D	2,4- Dichlorophenoxyessigsäure
35S-P	<i>CaMV35S</i> -Promotor aus dem <i>Blumenkohlmosaik-Virus</i>
40S-P	<i>Hv40S</i> -Promotor aus Gerste ( <i>Hordeum vulgare</i> )
<i>A.tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ACS	Acetosyringon
BBM	<i>BABY BOOM</i> -Gen
<i>B.distachyon</i>	<i>Brachypodium distachyon</i>
BAP	6-Benzylaminopurin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CCM <sub>M</sub>	Co-Kulturmedium von Mais
CIM <sub>B</sub>	Kallusinduktionsmedium für <i>B.distachyon</i>
CIM <sub>G</sub>	Kallusinduktionsmedium für Gerste
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DsRed	rot fluoreszierendes Protein der <i>Discosoma</i> sp.
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
eK	embryogener Kallus/embryogene Kalli
E <sub>max</sub>	Emissionswellenlänge bei Anregungsmaxima
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
<i>egfp</i>	<i>enhanced green fluorescent protein</i> -Gen
ggf.	gegebenenfalls
<i>gus</i>	modifiziertes $\beta$ - <i>GLUCURONIDASE</i> -Gen
GUS	$\beta$ -Glucuronidase
<i>egfp:gus</i>	fusioniertes Gen aus <i>egfp</i> und <i>gus</i>

<i>hpt</i>	modifiziertes <i>HYGROMYCINPHOSPHOTRANSFERASE</i> -Gen
<i>HPT</i>	<i>HYGROMYCINPHOSPHOTRANSFERASE</i> -Gen
HPT	Hygromycinphosphotransferase
HYG	Hygromycin B
inkl.	inklusive
IL <sub>M</sub>	Inokulationsmedium für Mais
KI	Kallusinduktion
KM	Keimmedium
LB	linke Erkennungssequenz der T-DNA ( <i>left border</i> )
<i>LEC1</i>	<i>LAEFY COTYLEDON 1</i> -Gen
<i>LEC2</i>	<i>LAEFY COTYLEDON 2</i> -Gen
LS-Medium	Medium nach Linsmaier und Skoog
MS-Medium	Medium nach Murashige und Skoog
MS0	MS-Medium ohne Wachstumsregulatoren
n	Probenumfang
N6	N6-Medium
N60	N6- Medium ohne Wachstumsregulatoren
<i>NOS-T</i>	<i>NOPALINSYNTHASE</i> -Terminator aus <i>A.tumefaciens</i>
OD <sub>600</sub>	optische Dichte (gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm)
OS	Oberflächensterilisation
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglycol
PEMs	proembryogene Massen
pH	pH-Wert
psi	Pfund pro Quadratzoll ( <i>pound-force per square inch</i> )
R2	R2-Medium
RB	rechte Erkennungssequenz der T-DNA ( <i>right border</i> )
rK	Pflänzchen-regenerierende Kalli
RM	Regenerationsmedium
RNA	Ribonucleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuklease



rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
sE	somatische Embryonen
<i>sgfp</i>	<i>synthetic green fluorescent protein</i> -Gen
sp.	Spezies
<i>St-LSI</i> -Intron	Intronsequenz aus <i>Solanum tuberosum</i>
st.	steril
T-DNA	Transfer-DNA
Tim	Timentin
Ti-Plasmid	tumorinduzierendes Plasmid
<i>UBI-1-P</i>	<i>UBIQUITIN</i> -Promotor mit 1. Intron aus Mais
uE	unreife Embryonen
UV-Licht	ultraviolettes Licht
<i>vir</i>	Virulenzgene
z.T.	zum Teil
Z <sub>x</sub>	Zeitpunkt x



# 1 Einleitung

Durch gezielte Veränderung der Erbinformation ist es mittlerweile möglich, Kulturpflanzen gezielt zu verbessern, indem der Pflanze z.B. Resistenzen gegen Schädlinge, Herbizide, Trockenheit oder Kälte verliehen werden oder, indem ihre Produktivität bzw. der Nährstoffgehalt erhöht wird. Entscheidende Voraussetzung dafür ist jedoch, dass zunächst entsprechende Kenntnisse über das pflanzliche Genom, Stoffwechselkreisläufe sowie Resistenz- oder Toleranzmechanismen erarbeitet werden, was insbesondere über die Erforschung der Funktion und Regulation von Genen erfolgt (Müller-Röber, 2008). Dies geschieht zumeist anhand von Modellpflanzen wie z.B. *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) oder *Oryza sativa* (Reis). Ausgehend von den dabei gewonnenen grundlegenden Erkenntnissen lassen sich dann auch die spezifischen Gegebenheiten bei anderen, wirtschaftlich z.T. bedeutenderen, auf genetischer Ebene jedoch komplexer aufgebauten Arten erforschen (Flavell, 2009). Dabei ist selbstverständlich davon auszugehen, dass sich unterschiedliche Arten im Laufe der Evolution, Domestikation und der zielgerichteten Pflanzenzüchtung unterschiedlich entwickelt haben und somit auch bezüglich ihrer Eigenschaften und der entsprechenden molekularen Mechanismen verschieden sind, Analogien also mit zunehmender Verwandtschaft eher zu erwarten sind (Flavell, 2009).

Die weltweit am häufigsten angebauten Kulturpflanzen sind die Getreidearten Mais, Reis, Weizen und Gerste. Diese zählen zur Familie der Süßgräser (*Poaceae*) und sind einkeimblättrig (monokotyl), weshalb man viele Eigenschaften der Ackerschmalwand, der bedeutendsten experimentellen (zweikeimblättrigen, dikotylen) Modellart, nicht ohne Weiteres übertragen kann (Christiansen *et al.*, 2005). Die biologischen Unterschiede zwischen einkeimblättrigen und zweikeimblättrigen Pflanzen, die sich seit ca. 150 Millionen Jahren unabhängig voneinander entwickeln, sind also keinesfalls zu vernachlässigen. So unterscheiden sie sich grundlegend bezüglich zahlreicher morphologischer Eigenschaften, aber z.B. auch im Zellwandaufbau, der durch verschiedene Hauptstrukturpolysaccharide und deren

Verbindung sowie unterschiedliche Proteine, Pektine und phenolische Verbindungen charakterisiert ist (Carpita, 1996; Vogel und Bragg, 2009).

Um für die Forschung die Lücke zwischen *Arabidopsis* und den wirtschaftlich bedeutenden Getreiden zu schließen, war es notwendig, eine Modellpflanze für die Gruppe der Monokotyledonen zu finden. Somit wurde neben dem Genom von *Arabidopsis thaliana* auch das von Reis (*Oryza sativa*) vollständig sequenziert und diese als Modellpflanze etabliert (Draper *et al.*, 2001). Dennoch ergaben sich einige Nachteile, einerseits in Bezug auf die speziellen Wachstumsbedingungen, andererseits auf die verhältnismäßig geringe Verwandtschaft zu den Getreidearten der gemäßigten Breiten, die dem Tribus *Triticeae* zugeordnet werden (Draper *et al.*, 2001). Reis ist ein semiaquatisches, tropisches Gras und verfügt nicht über einen Teil der relevanten Merkmale, die in anderen Getreiden und auch Futtergräsern aus der gemäßigten Klimazone untersucht und beeinflusst werden sollen. Wichtige Eigenschaften, die spezifisch an Gräsern der gemäßigten Breiten erforscht werden, sind zum Beispiel verschiedene Pathogenresistenzen, Überwinterungs- und Frosttoleranzen, Vernalisation, das Perennieren (einschließlich Meristemruhemechanismus), Grasdeckenverhalten und die Nacherntebiochemie von Silagen (Draper *et al.*, 2001). Aufgrund dieser Tatsachen erwies sich Reis als Modellpflanze für die gemäßigten Kulturarten nur wenig geeignet. Im Jahre 2001 wurde daraufhin *Brachypodium distachyon*, ein kleines, einjähriges Gras, als neue Modellpflanze mit weit näherer Verwandtschaft zu den Triticeen diskutiert (Draper *et al.*, 2001; Vogel und Bragg, 2009).

### 1.1 *Brachypodium distachyon*

*Brachypodium distachyon* (*B.distachyon*) - abgeleitet vom griechischen *brachýs* = kurz, *pódion* = Füßchen und *distáchyus* = zweijährig - gehört zur Gattung der Zwenken (Genaust, 1996). Die im Deutschen als zweijährige Zwenke bezeichnete Pflanze (Abbildung 1) ist ein Wildgras der gemäßigten Klimazone und gehört zur Unterfamilie *Pooideae*. Anders als seine nächsten Verwandten wie *B.mexicanum*, *B.sylvaticum* oder *B.pinnatum* und auch im Widerspruch zu seiner deutschen Bezeichnung, ist *B.distachyon* ein einjähriges Gras. Es ist vorrangig im Mittelmeerraum und im Nahen Osten angesiedelt, aber auch auf dem amerikanischen Kontinent und Asien wurden verschiedene Akzessionen gesammelt.

Das diploide Genom von *B.distachyon* ist mit ca. 300 Mbp etwa 2,25-mal so groß wie das von *Arabidopsis thaliana* und 16mal kleiner als das der Gerste, die das bislang bedeutendste experimentelle Modell der Getreidearten der gemäßigten Breiten darstellt. Es liegt in diploiden, tetraploiden und hexaploiden Akzessionen vor, die sich in Größe und Generationszeit unterscheiden (Mockler, 2010). Die diploide Form von *B.distachyon*, zu der auch die sequenzierte Inzuchtlinien Bd21 und Bd21-3 gehören, besitzt  $2n=10$  Chromosomen (Opanowicz *et al.*, 2008).

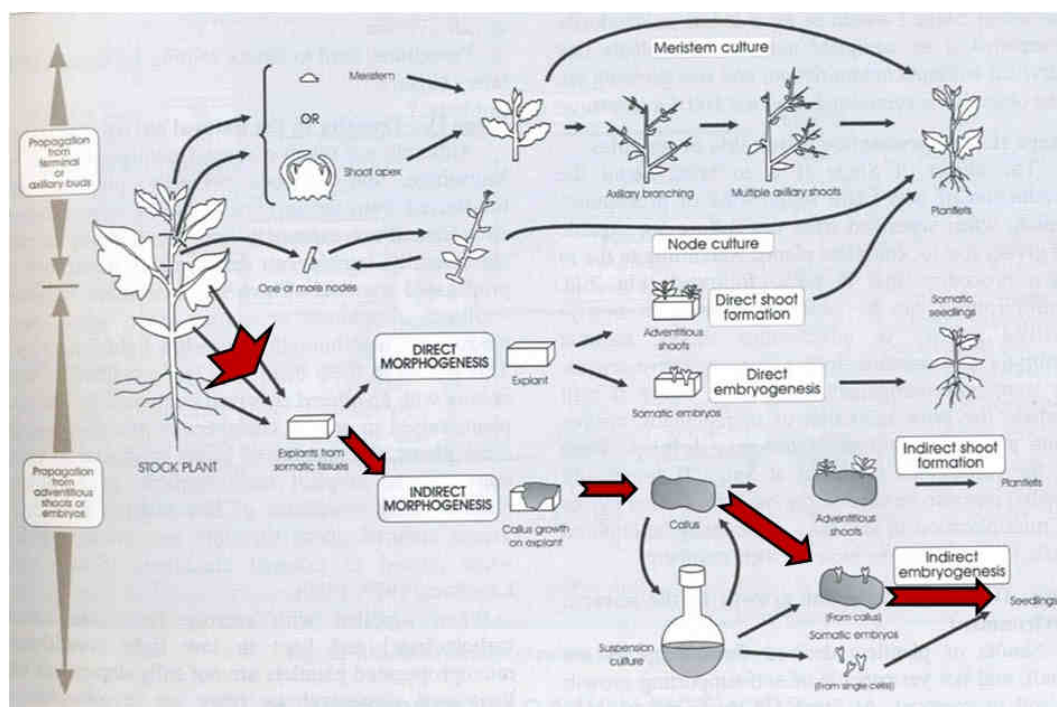
Eine Generationsdauer liegt für die meisten Akzessionen zwischen 10-18 Wochen mit vorangegangener Vernalisation. Bei den speziellen Inzuchtlinien wie Bd21 und Bd21-3 kann unter Langtagbedingungen (20 h Licht/Tag) ohne Vernalisation bereits nach acht Wochen Saatgut gewonnen werden (Vogel und Bragg, 2009). Im Gewächshaus ist es möglich, 1.000 Pflanzen pro Quadratmeter zu kultivieren. Im Vergleich dazu sind es bei Weizen maximal 50 und bei Reis 36 (Vogel und Bragg, 2009). Somit liefert dieses Gras auf geringem Raum ausreichend Saatgut und Material für experimentelle Arbeiten.



**Abbildung 1: *B. distachyon* Linie Bd21-3**

## 1.2 Pflanzenzellkultur

Eine wichtige Voraussetzung für die Etablierung einer neuen Modellart ist ein funktionierendes Zellkultursystem und die Kompetenz, diese Kulturen gentechnisch zu verändern und anschließend transgene Pflanzen daraus zu regenerieren (Christiansen *et al.*, 2005). Für die Transformation und Regeneration von Monokotyledonen hat sich vor allem der Weg über die Pflanzenzellkultur, im speziellen Kalluskulturen, als besonders geeignet erwiesen, da die direkte Neubildung von Pflanzen aus Blattmaterial - im Gegensatz zu Dikotylen - trotz vielfältiger experimenteller Ansätze bisher nur in wenigen Spezialfällen gelungen ist (Hensel *et al.*, 2009). In Abbildung 2 sind die verschiedenen Wege zur klonalen Vermehrung von Pflanzen über Zellkulturen gezeigt, wobei folgend nur auf den in dieser Arbeit verwendeten, rot gekennzeichneten Pfad näher eingegangen werden soll.



**Abbildung 2: Prinzipielle Methoden der klonalen Vermehrung von Pflanzen (Mikropropagation)**

**Der rote Pfad zeigt die in dieser Arbeit angewandte Methode über Kalluskulturen und somatische Embryogenese. (George und Debergh, 2008)**

### 1.2.1 Kalluskulturen

Ein Kallus besteht aus undifferenzierten Zellen, die sich in unorganisierter Form teilen und ein amorphes, zusammenhängendes Gewebe bilden. *In vitro* kann die Kallusbildung - in vielen Fällen auch ohne Anwesenheit von Licht - durch Kultivierung von verschiedenen Explantaten einer Pflanze auf wachstumsstimulierendem Medium induziert werden, wobei dies nicht bei allen Gewebetypen mit gleicher Effizienz gelingt und eine Dedifferenzierung der Zellen voraussetzt. Diese Nährmedien bestehen neben anorganischen Salzen aus verschiedenen organischen Verbindungen wie Zuckern, die als Kohlenstoffquelle sowie zur Gewährleistung osmotisch verträglicher Bedingungen benötigt werden, und Vitaminen. Das für Tabak von Murashige und Skoog (1962) entwickelte Kulturmedium (MS-Medium) gehört zu den bekanntesten Pflanzengewebekulturmedien und findet – häufig in modifizierter Form - auch für Kalluskulturen aus unreifen Embryonen (uE) von Getreiden wie Weizen, Gerste und Triticale Anwendung (Hensel *et al.*, 2009). Als besonders förderlich für die aktive Zellteilung und Dedifferenzierung der Zellen erwies sich die Zugabe von Wachstumsregulatoren oder anderen Substanzen mit regulatorischen Effekten. Vollständig dedifferenzierte Zellen lassen sich strukturell nicht ohne Weiteres dem Gewebe zuordnen, aus dem sie entstanden sind und besitzen z.T. die Potenz, sich wieder zu differenzieren und spezialisierte Zellen zu bilden, aus denen wiederum ganze Organe entstehen können.

Bei Dikotylen ist die Auswahl an Pflanzenexplantaten für die Kallusinduktion sehr groß, wobei sich gerade junges, teilungsaktives Gewebe besonders gut eignet. Bei den Getreiden hingegen, die zu den Monokotyledonen gehören, ist die Wahl von Ausgangsmaterial mit regenerativer Kompetenz eher auf Gewebeteile zygotischer Embryonen, meristematischer Bereiche oder unreifer Pollen beschränkt. Das Kalluswachstum kann hier meist nur durch vergleichsweise hohe Konzentrationen von synthetischen Auxinanaloga wie 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) induziert werden. Oftmals ist das Kallusgewebe nicht vollständig



undifferenziert und kann sich, abhängig davon, aus welchem Explantat und unter welchen Bedingungen es entstanden ist, im strukturellen Erscheinungsbild seiner Oberfläche, seiner Farbe, dem Grad der Verdichtung und seinem morphogenen Potential unterscheiden.

Die Neubildung von Pflanzen aus Kallusgewebe wird als Regeneration bezeichnet und kann nach zwei unterschiedlichen Prinzipien ablaufen. Zum einem können sich durch Organogenese aus meristematischem Kallusgewebe Blätter bzw. Sprosse (Caulogenese) oder Wurzeln (Rhizogenese) bilden, aus denen sich später Pflanzen entwickeln. Die andere Möglichkeit ist die Entwicklung von Pflanzen aus somatischen Embryonen, die von einem embryogenen Kallus durch somatische Embryogenese gebildet werden können. Diese Art der Reproduktion wird in der Gewebekultur und genetischen Transformation favorisiert, da sie besonders effizient ist und die resultierenden Pflanzen auf eine Einzelzelle zurückgehen. (für weitere Informationen siehe: Kempken, Kempken und Stockmeyer, 2004; George, 2008; von Arnold, 2008)

### **1.2.2 Somatische Embryogenese**

Bei der somatischen Embryogenese werden Embryonen aus somatischen Zellen gebildet, die den zygotischen Embryonen morphologisch sehr ähnlich sind. Erste somatische Embryonen (sE) konnten 1958 durch Steward *et al.* und Reinert aus Suspensionskulturen von Karottenzellen gewonnen werden. SE können entweder direkt aus somatischen Zellen gebildet werden oder indirekt durch eine vorangegangene Kallusphase. Das Kallusgewebe, welches in der Lage ist sE zu bilden, wird als embryogen bezeichnet und besteht aus proembryogenen Massen (PEM).

Unter Anwendung zur Verfügung stehender Methoden ist das embryogene Potential der Kalluskulturen in erster Linie von den Genotypen bestimmt. Dies konnte erfolgreich durch die Übertragung der Fähigkeit zur somatischen Embryogenese von potenten auf sich verweigernde Genotypen mittels Kreuzung gezeigt werden (Kielly und Bowley 1992). Aber auch epigenetische Veränderungen und

Umwelteinflüsse spielen eine wichtige Rolle (Morrish, Vasil und Vasil, 1987). Auf zellulärer Ebene betrachtet, wird der embryogene Signalweg in den dedifferenzierten Zellen durch Veränderungen der Genexpression in Folge von Auxinbehandlung induziert und hat die Bildung von Polaritäten in den Zellen zur Folge. Aus denen können sich PEM und später sE bilden. Allerdings sind nicht alle Zellen des Ausgangsexplantates in der Lage, diese Entwicklung zu vollziehen. Gerade bei Getreiden ist diese Kompetenz auf Zellen beschränkt, deren Ursprung embryogener oder meristematischer Art ist, und nimmt mit zunehmendem Alter und Differenzierungsgrad ab (Fehér, 2006). Neben der notwendigen Behandlung mit Auxinen (meist 2,4-D) kann sich auch die Anwesenheit von Cytokinin fördern auf die Induktion von sE auswirken. In einigen Spezies konnte auch ein stimulierender Effekt von reduzierten Stickstoffformen oder der Art der Kohlenstoffquelle belegt werden.

Die Vorreifung von sE aus embryogenem Kallusgewebe erfolgt meist unter Ausschluss oder Reduzierung der Auxinkonzentration im Medium. Die anschließende Reifung der sE hat morphologische und biochemische Änderungen zur Folge. Es kommt zur Umlagerung von Speicherprodukten, der Differenzierung von Cotyledonen und es erfolgen die Unterdrückung der Keimung (Dormanz) und der Erwerb von Trockentoleranz (Thomas, 1993).

Die Regeneration von Pflanzen aus sE erfolgt im Gegensatz zur Kallusinduktion grundsätzlich unter Anwesenheit von Licht. In manchen Fällen können dem Medium zugesetzte Phytohormone stimulierend auf die Keimung wirken, sie sind jedoch nicht immer erforderlich. Dennoch führt die Entwicklung von sE nicht zwangsläufig zur Regeneration von Pflanzen, da beides unabhängige Prozesse sind und auch hier wieder der genetische und epigenetische Faktoren sowie Umwelteinflüsse eine wichtige Rolle spielen. Der komplexe Prozess der somatischen Embryogenese und die dabei vorliegenden Bedingungen wirken sich ebenfalls auf das Wachstum und die Überlebensfähigkeit der gebildeten, kleinen Pflanzen aus. So kann es mit steigender Kulturdauer zu somaklonalen Variationen zwischen den

Regeneraten kommen (Larkin und Scowcroft, 1981). (für weitere Informationen siehe: Krautwig und Lörz, 1996, Kempken, Kempken und Stockmeyer, 2004; Fehér, 2006; George, 2008; Torpe, 2008; von Arnold, 2008, )

In den letzten Jahren intensiver Forschung konnten einige Gene identifiziert werden, die spezifisch auf die somatische Embryogenese Einfluss nehmen. Die Gene *LAEFY COTYLEDON 1 (LEC1)*, *LAEFY COTYLEDON 2 (LEC2)* und *BABY BOOM (BBM)* gehören zu den bekanntesten und gut studierten dieser Gruppe und können bei ektopischer Expression zu spontaner Entwicklung von sE auf vegetativen Gewebe führen (Lotan *et al.*, 1998; Stone *et al.* 2001; Boutilier *et al.*, 2002). Heidmann und Kollegen konnten aufbauend auf diesen Erkenntnissen die somatische Embryogenese und Regeneration in *capsicum annuum* durch transiente Expression von *BBM* induzieren und somit schwer regenerierbare Sorten dem *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer zugänglich machen (Heidmann *et al.*, 2011).

### 1.2.3 Genetische Transformation

Es gibt mehrere Möglichkeiten transgene Pflanzen zu erzeugen. Zu den bedeutendsten Methoden zählt die biolistische Transformation, die 1987 von Sanford *et al.* entwickelt wurde. Dabei werden DNA-beschichtete Metallpartikel - meist aus Gold oder Wolfram - mit einer Partikelkanone in die Zellen geschossen. Nachteil dieser Methode ist zum einen, dass die DNA oftmals nicht stabil ins Genom integriert wird und damit nur eine transiente Genexpression erfolgt. Andererseits wird aber auch ein vergleichsweise hoher Anteil an Pflanzen erzeugt, bei denen sehr viele und häufig auch unvollständige Kopien der rekombinanten DNA integriert worden sind, was zu negativen Erscheinungen wie Stilllegung durch genspezifischen Transkriptabbau und/oder Hypermethylierung der DNA oder Modifikation der Histone am Genlocus führen kann (Meyer, 1995).

Eine weitere Methode ist der Gentransfer in Protoplasten, bei der zellwandlose Zellen entweder unter Anwesenheit von Polyethylenglykol (PEG) oder durch

Elektroporation die DNA-Moleküle über die Zellmembran aufnehmen (Lörz, Baker und Schell, 1985). Hier kann es ebenfalls zu den unerwünschten Effekten wie bei der biolistischen Transformation kommen. Das größte Problem bei dieser Methode stellt allerdings die anschließende Regeneration vollständiger Pflanzen aus den transformierten Protoplasten dar.

Der *Agrobacterium*-vermittelte Gentransfer hingegen zeichnet sich eben durch hohe Effizienz stabiler Integration der Fremd-DNA bei vergleichsweise hohem Anteil von Ereignissen mit einer oder wenigen integrierten Kopien pro Zelle in regenerierbares Gewebe aus und soll im Folgenden kurz genauer beschrieben werden (Travella *et al.*, 2004).

### **1.2.4 *Agrobacterium*-vermittelter Gentransfer**

Die Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* (*A.tumefaciens*) macht sich dessen natürliche Fähigkeit zunutze, einen Teil seiner DNA in Pflanzenzellen übertragen zu können. Für das Bakterium selbst hat dies die Bildung von Tumoren an der Pflanze zum Vorteil, in denen es leben und sich von speziellen, ausschließlich von den Bakterien verwertbaren, Aminosäuren ernähren kann, deren Produktion ebenfalls nach Übertragung bakterieller DNA von den Pflanzenzellen übernommen wird. Die Gene, die diese Reaktionen auslösen, liegen auf einem 200 bis 800 kb großen Plasmid, dem Tumor induzierenden Plasmid (Ti-Plasmid), welches die auf dem in die Pflanzen zu übertragenden Transfer-DNA (T-DNA)-Abschnitt gelegenen Gene für die Tumorbildung und die Synthese der o.g. Aminosäuren sowie die Virulenzgene (*vir*) trägt. Die Virulenzregion des Plasmides kodiert für die Gene, die für die Erkennung von Wundstellen und das Ausschneiden und Übertragen der T-DNA als Einzelstrang in den Wirt notwendig sind. Die T-DNA wird von zwei Erkennungssequenzen (*left border* = LB und *right border* = RB) flankiert. Diese sind notwendig, damit nur dieser Bereich durch Endonukleasen aus dem Plasmid herausgetrennt und in die Pflanzenzelle übertragen wird. Für die biotechnologische Anwendung dieses Transformationssystems würde das

Vorhandensein der Ti-Gene für die Tumorbildung und die Synthese bakterieller Aminosäuren von Nachteil sein. Diese Gene wurden deshalb vom Ti-Plasmid entfernt und durch die gezielt einzubringenden Gensequenzen ersetzt. Die Verwendung von binären Vektorsystemen ist heute Stand der Technik und ermöglicht die Aufteilung der *vir*-Region und der modifizierten T-DNA auf zwei unterschiedliche Plasmide im *Agrobacterium*, was die Klonierungsschritte und das Einbringen der Vektoren in das Bakterium erheblich erleichtert.

In der Natur infiziert das Bodenbakterium normalerweise nur dikotyle Pflanzen, da diese bei Verletzung phenolische Substanzen produzieren, die von den Bakterien erkannt werden und zur Anlagerung an die Pflanzenzelle und Aktivierung der *vir*-Gene führen. Die Optimierung der Methode und Zugabe von Acetosyringon bei der Transformation, sowie die Verwendung hypervirulenter Agrobakterienstämme, denen zusätzliche Kopien den Gentransfer limitierender *vir*-Gene integriert wurden, ermöglichte es 1994 Reis als erste monokotyle Pflanze mit dieser Methode zu transformieren (Hiei *et al.*, 1994). Auf Grundlage dieses technologischen Durchbruchs gelang es in den folgenden Jahren, auch die meisten anderen Getreidearten - wie zum Beispiel Mais, Weizen, Gerste und Triticale - stabil zu transformieren (Ishida *et al.*, 1996; Cheng, Fry und Pang, 1997; Tingay, McElroy und Kalla, 1997; Hensel *et al.*, 2009).

### **1.3 Stand der Forschung – *B.distachyon* Kalluskulturen und genetische Transformation**

Die Vorteile der seit 2008 vollständig sequenzierten *B. distachyon*-Linie Bd21 sind anspruchslose Wachstumsbedingungen, geringer Platzbedarf, kurze Generationszeit, ein verhältnismäßig kleines, diploides Genom, Selbstbestäubung und die vergleichsweise nahe Verwandtschaft zu den *Triticeen*, d.h. zu den in Mitteleuropa vorwiegend angebauten Getreidearten. Dies macht dieses Wildgras, an dem nun seit einigen Jahren geforscht wird, zu einer vielversprechenden Modellpflanze. Eine essentielle Voraussetzung, um *B.distachyon* als Modellpflanze zu nutzen, ist die Erzeugung von transgenen Pflanzen. Grundlage dafür sind Zellkultursysteme,

die die Herstellung von Pflanzen aus transformierten Zellen - z.B. über die Entwicklung embryogener Kalli - ermöglichen.

Ein großer Nachteil der Gräserarten gegenüber dikotylen Pflanzen liegt darin, dass es in der Regel nicht möglich ist auf direkte Weise - wie z.B. an Blatträndern von Kalanchoeen oder über den Umweg einer Kallusbildung wie z.B. aus Blattsegmenten von Tabak - aus differenziertem Gewebe - wie z.B. Blattstücken oder eine gewisse Entwicklung durchlaufende Sprossabschnitte - Pflanzen zu regenerieren. Aufgrund dessen müssen spezielle Zellen und Gewebe wie Zygoten, unreife Embryonen (uE), unreife Pollen oder meristematische Sprossbereiche – z.T. bei hohen Auxinkonzentrationen im Nährmedium - kultiviert werden. Dies hat einerseits einen relativ hohen Arbeitsaufwand zur Folge und reduziert andererseits die Menge an verwertbarem Material pro Pflanze.

Bisher sind zur multiplen Regeneration von *B.distachyon* ausschließlich Karyopsen oder uE verwendet worden (Bablak *et al.*, 1995; Draper *et al.*, 2001; Christiansen *et al.*, 2005; Vogel, Leong und Hayden, 2006; Vogel und Hill, 2007; Vain *et al.*, 2007; Pacurar *et al.*, 2008).

Anfänglich wurden reife Körner auf für andere Gräser erfolgreich verwendeten Medien (MS, LS, N6, R2) mit unterschiedlichen 2,4-D-Konzentrationen kultiviert und die hervorgegangenen Kallustypen beschrieben (Bablak *et al.*, 1995). Bablak und Kollegen (1995) beobachteten, dass sowohl die Phytohormonkonzentration, als auch die Nährstoffzusammensetzung des Mediums sowie der Genotyp des Grases eine Auswirkung auf die Bildung von embryonem Kallus (eK) hatte. Die besten Ergebnisse (ca. 60% eK) konnten mit der diploiden Inzuchtlinie B200 auf LS-Medium (11,25 µM 2,4-D) erzielt werden, welche sich auch zu etwa 26% auf N60 Regenerationsmedium zu fertilen Pflanzen entwickeln ließ (Bablak *et al.*, 1995). Draper und Kollegen (2001) arbeiteten hingegen mit der polyploiden Linie ABR100 und verwendeten die heute übliche Embryonenkultur, indem unreife Körner 10-15 Tage nach der Anthese geerntet, die Embryonen heraus präpariert

und mit dem Skutellum auf dem von Bablak *et al.* (1995) beschriebenen LS und N6 Kallusinduktionsmedium (mit 11,25  $\mu$ M 2,4-D) sechs Wochen kultiviert wurden. Die isolierten Embryonen wurden in fünf Klassen unterschiedlicher Größe unterteilt, für die verschiedene Wachstumsgeschwindigkeiten, Ausbeuten und morphologische Eigenschaften der Kalli beobachtet wurden. Der als Typ II bezeichnete eK (cremig-weiß, krümelig, trocken) besaß die höchste Regenerationsrate auf MSO und N60 Regenerationsmedium und wurde am effizientesten aus 0,3-0,7 mm großen uE gewonnen (Ø 45%) (Draper *et al.*, 2001).

Draper und Kollegen transformierten den eK von ABR100 durch Beschuss mit Plasmid-DNA beschichteten Goldpartikeln und erreichten Effizienzen von bis zu sieben transgenen Pflanzen pro 1 g eingesetztem eK (Draper *et al.*, 2001). Der Nachweis für die erfolgreiche biolistische Transformation von diploiden Akzessionen erfolgte durch die Forschungsgruppe um Christiansen (2005). Von der Akzession BDR018 konnten 46 % der uE Kallus vom Typ II bilden, davon wurden die im hohen Maße embryogenen Kalli für den Partikelbeschuss verwendet und eine Transformationseffizienz von 5,3% unabhängigen Kalli erreicht, die transgene Pflänzchen regenerierten (Christiansen *et al.*, 2005).

Aufgrund der Nachteile, die sich durch die biolistische Transformation ergaben (siehe 1.2.3), wurde versucht den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer auch für *B.distachyon* zu etablieren. Vogel und Kollegen (2006) veröffentlichten das erste Protokoll für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von *B.distachyon* unter Verwendung des hypervirulenten Agrobakterienstammes AGL-1. Dem voran ging die Erzeugung von verschiedenen Inzuchtlinien und die Untersuchung der Kallusbildung und Regenerationsfähigkeit von 19 Akzessionen und Inzuchtlinien aus reifen und unreifen Körnern (Vogel, Leong und Hayden, 2006). Die Induktion von eK konnte bei der diploiden Inzuchtlinie Bd21 mit einer Effizienz von 2,9% aus reifen und 7,5% aus unreifen Körnern erfolgen. Allerdings war nur der embryogene Kallus von den unreifen Körnern in der Lage, Sprosse zu regenerieren. Mit 75% konnte für diese Linie (Bd21) das beste

Regenerationsergebnis der drei getesteten diploiden Genotypen erreicht werden (Vogel, Leong und Hayden, 2006). Die Transformationsraten des gebildeten eK aus verschiedenen Linien reichten von 0,4-15%, wobei sich nur zehn von 19 Linien überhaupt als transformierbar erwiesen (Vogel, Leong und Hayden, 2006). Die höchste Transformationseffizienz einer diploiden Linie konnte bei Bd21 mit 3,2% erreicht werden, solange der Kallus weniger als zwei Monate subkultiviert wurde (Vogel, Leong und Hayden, 2006).

Im Juli 2006 wurde von dem *DOE Joint Genome Institute* die vollständige Genomsequenzierung *Brachypodium distachyon* angekündigt, die 2008 für die Inzuchtlinie Bd21 beendet wurde (Gilbert, 2006). Währenddessen arbeiteten verschiedene Forschungsgruppen an der Etablierung eines Hochdurchsatz-Transformationssystems mittels *A.tumefaciens*. Vogel und Hill (2007) und Vain *et al.* (2007) steigerten unabhängig voneinander unter Verwendung sehr kleiner unreifer Embryonen (<0,3mm) die Ausbeute von eK auf 94% bzw. 68%. Sie erzeugten dazu spezielle Inzuchtlinien, die sich durch ihre gute Transformierbarkeit und hohe Embryogenität der Kalluskulturen auszeichneten. Vogel und Hill (2007) verwendeten für ihre Arbeiten die Inzuchtlinie Bd21-3, die aus dem selben Saatgutbestand (Akzession PI 254867) stammte wie die Linie Bd21, aber sich dennoch genetisch von dieser unterscheidet. Durch eine dreitägige Co-Kultur der Kalli nach der Inokulation auf Filterpapier konnte im Durchschnitt 36,5% eK erhalten werden, der fertile transgene Regenerate hervorbrachte. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Fertilität der regenerierten Pflanzen mit der Anzahl der Subkultivierungen nach der Transformation abnahm. Aus diesem Grund erfolgte der Transfer auf Regenerationsmedium so früh wie möglich (Vogel und Hill, 2007). Vain und Kollegen (2007) benutzen hingegen Pflanzen (Bd21-TC) als Donor für die uE, die aus der Gewebekultur der Linie Bd21 regeneriert wurden. Nach der Inokulation wurde ebenfalls wie bei Vogel und Hill (2007) eine Trockenphase eingefügt, die allerdings nur sieben Minuten betrug, darauffolgend wurden die Kalli auf Festmedium Co-kultiviert (Vain *et al.*, 2007). Sie



verbesserten somit die Transformationseffizienz gegenüber der Elternlinie Bd21 um das 3-fache auf 17% unabhängig transgene Pflanzenlinien pro inokulierten eK (Vain *et al.*, 2007). Beide Forschungsgruppen steigerten die Zahl an embryogenen Kalli, die für die Transformation eingesetzt wurden, indem sie den Kallus aus einem uE über mehrere Subkultivierungsschritte teilten, wobei mehr als zwei Teilungen wiederum die Regenerationsfähigkeit der Kalli reduzierte (Vogel und Hill, 2007). Păcurar und Kollegen (2008) verwendeten hingegen nur einen Kallus pro uE für die Transformation, da sie die Vorkulturdauer auf 17 Tage reduzierten. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine erhöhte Transformationseffizienz beobachtet, die mit der hohen Teilungsaktivität der Zellen beim Übergang vom uE zu Kallusgleichem Gewebe erklärt wurde. Somit erreichten sie eine durchschnittliche Effizienz von 55% stabil transformierter und pflanzenregenerierender Kalli der diploiden Linie BDR018 (Păcurar *et al.*, 2008).

Die bisher etablierten effizientesten Methoden für den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer von *B.distachyon* basieren auf uE als Ausgangsexplantat für die Kallusformation und haben den Nachteil, dass für die Bereitstellung der uE kontinuierlich eine Vielzahl von Donorpflanzen, unter kontrollierten Umweltbedingungen, angezogen werden müssen, um genügend Ausgangsmaterial im richtigen Stadium zu erhalten. Zudem ist die Präparation der winzigen uE bei *B.distachyon* außerordentlich schwierig und erlaubt daher keinen großen Durchsatz. Andererseits wird die langwierige Vermehrung von eK vor dem Gentransfer (Vain *et al.* 2007, Vogel und Hill, 2007) als problematisch bezüglich somaklonaler Variation angesehen. Die Gewinnung von eK aus Sprosssegmenten und deren Transformation ist eine bisher noch nicht für *B.distachyon* etablierte Methode und soll den Vorteil bringen, dass die reifen Körner - ohne Gewächshauskapazität zu benötigen - platz-, zeit- und ressourcensparend in Klimaprüfschränken ausgekeimt und die jungen Sprosse daraufhin auf vergleichsweise einfache Weise präpariert werden können.

In Vorversuchen im Rahmen einer Praktikumsarbeit konnte bereits exemplarisch gezeigt werden, dass die Induktion von eK aus Sprosssegmenten und die Regeneration von Pflanzen über somatische Embryogenese der Linie Bd21-3 möglich ist (Melzer, 2009). Hierfür wurde ein einfaches Kallusinduktionsmedium CIM<sub>B</sub> entwickelt, dem wahlweise 11,1 µM 2,4-D oder 22,2 µM 2,4-D zugefügt wurden (siehe Anhang Tabelle 14). Für die Regeneration der Pflanzen über somatische Embryogenese wurde dabei K4N-Medium verwendet (Kumlehn *et al.*, 2006). Desweiteren konnte beispielhaft die Expression der Reportergene (*sgfp* und *gus*) nach Infektion mit *A.tumefaciens* in den Kalli, als auch in den daraus regenerierten Pflanzen gezeigt werden. Hierfür wurden zwei modifizierte Protokolle von Vogel und Hill (2007) und Păcurar *et al.* (2008) verwendet. Eine statistische Erfassung der Effizienzen bezüglich Gewinnung von eK und rK sowie der Transformationseffizienz konnte aufgrund der geringen Probenumfänge nicht erfolgen. Zudem konnten die erhaltenen Linien in der vorgegebenen Zeit nicht mehr auf die stabile Integration der T-DNA untersucht werden (Melzer, 2009).

### 1.4 Ziel der Arbeit

Die Etablierung einer neuen Transformationsmethode für umfassende funktionelle Analysen von Genen und damit als Grundlage für die Erforschung von Entwicklungs- und Stoffwechselvorgängen anhand der Modellpflanze *B.distachyon* setzt ein zuverlässiges und effizientes Kallusinduktions- und Regenerationssystem voraus. Sprosssegmente sollen in diesem Zusammenhang als Alternative zu unreifen Embryonen als Ausgangsexplantat verwendet und validiert werden. Potenzielle Vorteile dieser Methode werden darin gesehen, dass die aufwändige Bereitstellung von im Gewächshaus angezogenen Pflanzen unnötig wird und die einfache Präparation der Explantate einen vergleichsweise hohen Durchsatz ermöglicht. Ziel dieser Arbeit ist es daher, die im Rahmen einer Praktikumsarbeit („Transformation von *B.distachyon* durch *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer in Sprossbasis-Segmente“ (Melzer, 2009)) entwickelte und exemplarisch erprobte Methode zu

reproduzieren, weiter zu optimieren und bezüglich Effizienz und Handhabbarkeit zu bewerten.

Gegenstand der Untersuchungen ist die Erzeugung embryogener Kalluskulturen aus Sprosssegmenten und die Regeneration von Pflänzchen über somatische Embryogenese. Durch Zugabe bzw. Variation einiger Komponenten im Kallusinduktionsmedium, bzw. die Änderung der Größe der Segmente, soll zudem versucht werden, die Präparation weiter zu vereinfachen und ggf. die Induktionsrate an embryogenen und regenerierenden Kalli zu steigern.

Des Weiteren soll die Anwendbarkeit modifizierter Protokolle von Gerste, Mais und *B.distachyon* für den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer in Sprosssegmentkallus getestet und transgene Pflanzen erzeugt werden. Durch Analyse der T<sub>1</sub>-Generation ausgewählter, im Rahmen des Praktikums erzeugter primärtransgener Pflanzen, soll in diesem Zusammenhang der Beweis erbracht werden, dass die stabile Integration von Markergenen in das Genom von *B.distachyon* mittels *A.tumefaciens* unter Verwendung von Sprosssegmentkallus als Zielgewebe möglich ist und diese funktionell aktiv sind.

Letzter Bestandteil der Arbeit ist die Erzeugung eines Binärplasmids, welches das *HYGROMYCINPHOSPHOTRANSFERASE*-Gen und die Sequenz für ein Fusionsprotein aus *Green Fluorescence Protein* und  $\beta$ -Glucuronidase auf der T-DNA trägt. Damit soll in zukünftigen Arbeiten die Detektion transgenexprimierender Gewebe je nach Notwendigkeit anhand unterschiedlicher Nachweisverfahren - etwa zur Analyse des Expressionsprofils von Promotoren - ermöglicht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Pflanzenmaterial und -anzucht

Saatgut von *B.distachyon* der Linie Bd21-3 wurde von J. Vogel zur Verfügung gestellt (Vogel und Hill, 2007). Die Pflänzchen wurden eine Woche nach Aussaat in Substrat 1 (Klasmann, D) pikiert und in 6 cm Töpfe mit Substrat 2 (Klasmann, D):Kompost:Sand (2:2:1) gesetzt. Für zwei Wochen wurden sie bei Langtagbedingungen (16 h Licht,  $170 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) und 22°C Tag/20°C Nacht im Gewächshaus angezogen und anschließend in 13 cm Töpfe gepflanzt (gleiches Substrat). Die weitere Kultivierung bis zum Abreifen des Saatgutes erfolgt bei Langtagbedingungen (16 h Licht,  $170 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) und 17°C Tag/15°C Nacht. Das Saatgut wurde anschließend bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Die aus den Kalluskulturen regenerierten Pflänzchen wurden, sobald sie Spross und Wurzel besaßen, in 6 cm Töpfe mit Substrat 2:Kompost:Sand (2:2:1) gepflanzt und nach vier Wochen in 13 cm Töpfe umgesetzt. Die Anzucht erfolgte bei Langtagbedingungen (16 h Licht,  $170 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ) und 22°C Tag /20°C Nacht bis zum Abreifen der Körner.

#### 2.1.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Sequenzierung der Plasmid-DNA wurden bei der Firma Metabion (München, D) bestellt (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Oligonukleotide mit Basensequenz**

<i>Bezeichnung</i>	<i>Basensequenz</i>
<b>Bie475</b>	5'-TTT AGC CCT GCC TTC ATA CG-3'
<b>GH-Gfp-F1</b>	5'-GGT CAC GAA CTC CAG CAG GA-3'
<b>GH-Gfp-R1</b>	5'-GAC CAC ATG AAG CAG CAC GA-3'
<b>GH-Gfp-R2</b>	5'-TAC GGC AAG CTG ACC CTG AA-3'

<b>GH-Hpt-F1</b>	5'-GAT CGG ACG ATT GCG TCG CA-3'
<b>GH-Hpt-R2</b>	5'-TAT CGG CAC TTT GCA TCG GC-3'
<b>GH-NOS-R1</b>	5'-GCG CGC TAT ATT TTG TTT TC-3'

### 2.1.3 Bakterienstämme

Für den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer wurde der hypervirulente *A. tumefaciens* Stamm *AGL-1* (Lazo, Stein und Ludwig, 1991) verwendet. Die Vermehrung der Plasmide für die Klonierung und deren Selektion erfolgte mit *E.coli* *DH10B* ( $F^-$  *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*dlacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *endA1* *recA1* *deoR*  $\Delta$ (*ara,leu*)7697 *araD139* *galU* *galK* *nupG* *rpsL*  $\lambda^-$ ')(Grant *et al.*, 1990), welcher von der Firma Invitrogen (D) bezogen wurde.

### 2.1.4 Plasmide

Für die Erstellung des neuen Binärplasmids pBM279 (siehe 2.2.1.2) wurden drei unterschiedliche Ausgangsvektoren verwendet (pGH129-2, Ubi-AB-M und p6int-Ubi).

Der Vektor pGH129-2 dient im ersten Klonierungsschritt als Rückgrat und enthält die Sequenz des *enhanced green fluorescent protein:β-Glucuronidase* Fusionsproteins (*egfp:gus*) unter der Kontrolle des *HvS40* -Promotors (*S40 P*) aus *Hordeum vulgare* und des *CaMV35S* -Terminator (*T 35S*) aus dem *Blumenkohlmosaik-Virus*, dem noch der *NOPALINSYNTHASE* -Terminator (*T NOS*) aus *A.tumefaciens* folgt (G. Hensel, unveröffentlicht) (Abbildung 3). Außerdem trägt das Plasmid neben dem Replikationsursprung *ColEI*, für die Vermehrung in *E.coli*, ein Ampicillin-Resistenzgen (nicht dargestellt).



Abbildung 3: verwendeter Sequenzabschnitt des Vektors pGH129-2 von G. Hensel

Der Vektor pUbi-AB-M ist ein generischer Zwischenvektor zur konstitutiven Überexpression von Genen. Er enthält den *UBIQUITIN*-Promotor aus Mais mit 1. Intron (*Ubi-1 P*) und einen *NOS*-Terminator. Dazwischen befindet sich eine *multiple-cloning-site* (*MCS*) mit *Sfi*I-Restriktionserkennungssequenz zur Integration von kodierenden Sequenzen (Abbildung 4). Der Vektor trägt den Replikationsursprung *ColEI* und das Ampicillin-Resistenzgen für die Vermehrung in *E.coli* (nicht dargestellt) (DNA-Cloning-Service, Hamburg, D).

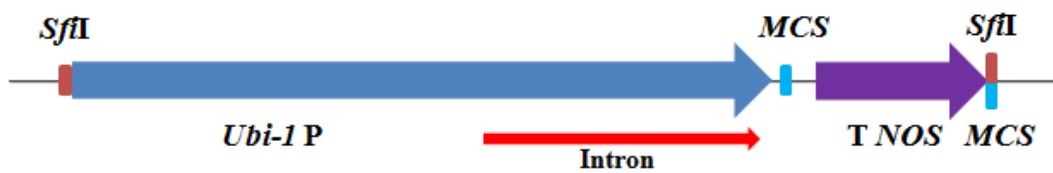


Abbildung 4: verwendeter Sequenzabschnitt des Vektors pUbi-AB-M

Die Rückgrat-Sequenz für den Binärvektor, der im zweiten Schritt entstehen soll, liefert das Binärplasmid p6int-Ubi. Es trägt das *HYGROMYCINPHOSPHOTRANSFERASE*-Gen (*hpt*) mit dem *St-LS1*-Intron aus *Solanum tuberosum*, unter der Kontrolle des Mais *UBI-1* Promotors und dem *CaMV35S* Terminator, als Selektionsmarker. Durch eine *MCS* am rechten Ende der T-DNA ist die Möglichkeit zur Integration der Expressionskassette gegeben (Abbildung 5). Neben dem Replikationsursprung *ColEI* für die Vermehrung in *E.coli* trägt das Binärplasmid die *pVS1*-Replikationssequenz für die Amplifizierung in *A.tumefaciens* und die Resistenzgene gegen Spectinomycin und Streptomycin (nicht dargestellt) (DNA-Cloning-Service, Hamburg, D).

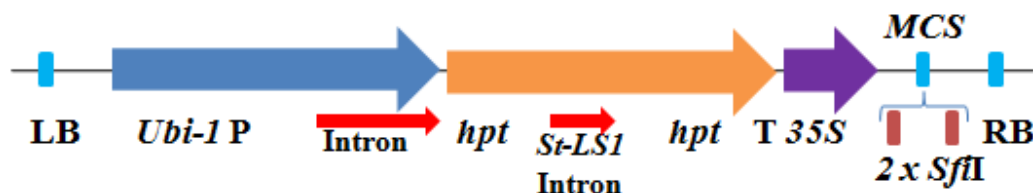


Abbildung 5: T-DNA des Vektors p6int-Ubi

Für den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer des Sprosssegmentkallus wurde das Binärplasmid pGH215 von Götz Hensel (IPK Gatersleben, AG Pflanzliche Reproduktionsbiologie) verwendet (Abbildung 6). Es trägt als Markergen die Sequenz des synthetischen *green fluorescent proteins (sgfp)*, welches unter der Kontrolle des *UBI-1*-Promotors steht und von dem *NOS*-Terminator begrenzt wird. Als Selektionsmarker wird das *HYGROMYCINPHOSPHOTRANSFERASE*-Gen ohne Intron (*HPT*) unter Kontrolle des verstärkten *CaMV35S*-Promotors und dem *CaMV35S* -Terminator verwendet.



Abbildung 6: T-DNA Sequenz des Binärvektors pGH215 von G. Hensel

### 2.1.5 Medien und Lösungen

Die hergestellten Medien und Lösungen sowie die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Geräte sind im Anhang aufgeführt.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Klonierungsarbeiten**

#### **2.2.1.1 Allgemeine Techniken und verwendete Materialien**

##### **Vermehrung der Ausgangs- und Zwischenvektoren**

Die Vektoren pGH129, Ubi-AB und pBM-152-2-1/2 wurden mittels Elektroporation (siehe 2.2.1.1) in elektrokompetente *E.coli DH10B*-Zellen eingebracht. Diese wurden im LB-Flüssigmedium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 37°C im dunklen Schüttelschrank (180 rpm) für maximal 12 h – 24 h kultiviert.

##### **Isolierung der Plasmid-DNA**

Die Plasmid-DNA wurde aus 2 ml Übernachtschüttelkultur von *E.coli DH10B* mit dem „QIAprep Spin Minikit“ (QIAGEN, D) nach Protokoll des Herstellers (Stand 2008) isoliert und bei – 20°C gelagert. Die DNA für das Partikelbombardment wurde mit dem „QIAgen Spin Midikit“ (QIAGEN, D) aus 50 ml Kulturvolumen nach Herstellerprotokoll (Stand 1998) gewonnen.

##### **Enzymatische Restriktion von Plasmid-DNA**

Die Restriktion erfolgte mit Restriktionsendonukleasen von Fermentas (D) nach Herstellerangaben (2009). Die Enzyme wurden für 5 min bei 75°C inaktiviert. Bei Doppelspaltungen wurde die Menge Wasser um das Volumen des zusätzlichen Enzyms reduziert und der Tango-Puffer (Fermentas, D) verwendet.

##### **Auftrennung von Spaltungsfragmenten mittels Gelelektrophorese**

Nach dem Verdau wurden 2 µl Blaumarker zum Ansatz hinzugefügt und diese auf ein 0,8% (w/v) Agarosegel, mit 0,12 mg Ethidiumbromid auf 400 ml 0,5xTBE, aufgetragen. Die Gelelektrophorese fand horizontal in 0,5xTBE Laufpuffer bei 170 V und je nach Fragmentlänge bis zu 90 min statt. Als Größenstandard wurde der „Generuler™ DNA Ladder mix“ (Fermentas, D) verwendet.



### **Eluierung von Plasmidfragmenten aus Agarosegelen**

Die aus dem Gel geschnittenen DNA-Banden wurden mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (QIAGEN, D) nach Herstellerprotokoll (Stand 2006) behandelt und somit die Plasmidfragmente herausgelöst.

### **Ligation der Plasmid-Fragmente**

Die Ligation der vorab erzeugten Fragmente wurde nach Herstellerangaben („PureExtreme-Protokolle“, Fermentas, Stand 2010) mit der T4-Ligase (Fermentas, D) durchgeführt. Lediglich die Inkubation wurde abweichend bei 12°C für 12 h im Thermocycler vorgenommen und die Ligase anschließend bei 65°C für 10 min inaktiviert. Im Falle einer „*blunt-end*“-Ligation wurde dem Ansatz PEG 4000 (Fermentas, D) laut Protokoll hinzugegeben, um die Verfügbarkeit des Inserts in der Lösung zu erhöhen, welches vor der Transformation durch Aufreinigung der DNA mit dem „PCR Purification kit“ (QIAGEN, D) wieder entfernt wurde.

### **Plasmidtransfer in elektrokompente *E.coli*-Stämme durch Elektroporation**

Der Transfer der Plasmid-DNA in elektrokompente *E.coli*-Stämme (*DH10B* nach Sambrook *et al.*, 1989 hergestellt) erfolgte mit dem „Gene Pulser II“ mit „Puls Controller Plus“ in 0,2 cm „Gene Pulser“ Küvetten von Bio-Rad Laboratories (D). Es wurden 1,5 µl Plasmid-DNA zu 50 µl *DH10B*-Suspension gegeben und in eine gekühlte Küvette pipettiert, an die 2,4 kV für 4,8 – 5,0 ms angelegt wurden. Danach wurde unverzüglich 500 µl SOC-Medium hinzugefügt und alles für 60 min bei 37°C in 1,5 ml Reaktionsgefäßen inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der Suspension auf festes LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (pBM-152-2-1/2) oder 100 µg/ml Spectinomycin (pBM279) ausplattiert. Der verbleibende Rest wurde pelletiert, in 100 µl SOC-Medium resuspendiert und ebenfalls auf einer Agarplatte mit LB-Medium mit Selektion ausgestrichen. Die Kulturschalen wurden einen Tag bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Einzelkolonien separat in 2 ml flüssigem LB-Medium mit Selektion angeimpft und bis zu 16 h bei 37°C und 180 rpm dunkel inkubiert. Die Isolierung der Plasmide

erfolgte wie oben beschrieben. Anschließend wurde die Plasmid-DNA routinemäßig durch Restriktion überprüft und die veränderten Bereiche des Vektors sequenziert.

### **Sequenzierung der Plasmid-DNA**

Die partielle Sequenzierung der erstellten Vektoren erfolgte durch LGC Genomics GmbH (Berlin, D).

### **Biolistischer Gentransfer in Gerstenembryonen zur Verifikation der Vektorfunktionalität**

Für den Nachweis, dass die klonierten Gene in der Pflanzenzelle funktionell aktiv sind, wurde der erstellte Zwischenvektor (pBM215) durch Partikelbombardment in die Gerstenembryonen eingebracht. Zunächst wurden 0,5–2 mm große, unreife Embryonen aus Gerstenkaryopsen isoliert und auf festem MS-Medium mit 100 g/l Saccharose einen Tag im Dunkeln bei 21°C vorkultiviert. Die Präparation der Mikroprojekte (0.6 Micron Gold 1652262, Bio-Rad Laboratories, D) und der Beschuss erfolgten nach dem Protokoll von Kikkert (Kikkert, 1998) mit dem „Bio-listic PDS-1000/He Partikel *delivery system*“ von Bio-Rad Laboratories (D) mit einem Helium-Druck von 600 psi.

Die Explantate wurden anschließend einen Tag bei 21°C im Dunkeln inkubiert und am Binokularmikroskop „Leica MZFL“ mit einem Filterset GFP Plant (Leica Mikrosystems, D) auf GFP-Expression untersucht. Abschließend wurde ein Gus-Assay durchgeführt.

#### **2.2.1.2 Klonierungsablauf**

Für die Klonierung wurden die Vektoren pGH129-2, pUbi-AB-M und p6int-Ubi verwendet (siehe 2.1.4). Ziel der Klonierung war die Herstellung des Binärplasmids pBM279, dessen T-DNA *hpt* als Selektionsmarker mit *St-LSI*-Intron enthält. Die Transkription des *hpt*-Gens sollte durch den *UBI-1*-Promotor mit 1. Intron kontrolliert und durch den 35S-Terminator begrenzt werden. Das Fusionsreporter-

gen *egfp:gus* sollte ebenfalls unter der Kontrolle eines *UBI-1*-Promotors mit 1. Intron und eines 35S-Terminators stehen. Der sich noch anschließende *NOS*-Terminator konnte durch Restriktion nicht entfernt werden und wurde als nicht störendes Klonierungsartefakt in Kauf genommen. Die Klonierung erfolgte in zwei Schritten über einen Zwischenvektor (pBM152) und ist in Abbildung 7 und 8 schematisch dargestellt.

### Klonierungsschritt 1: Erstellung des Zwischenvektors pBM152

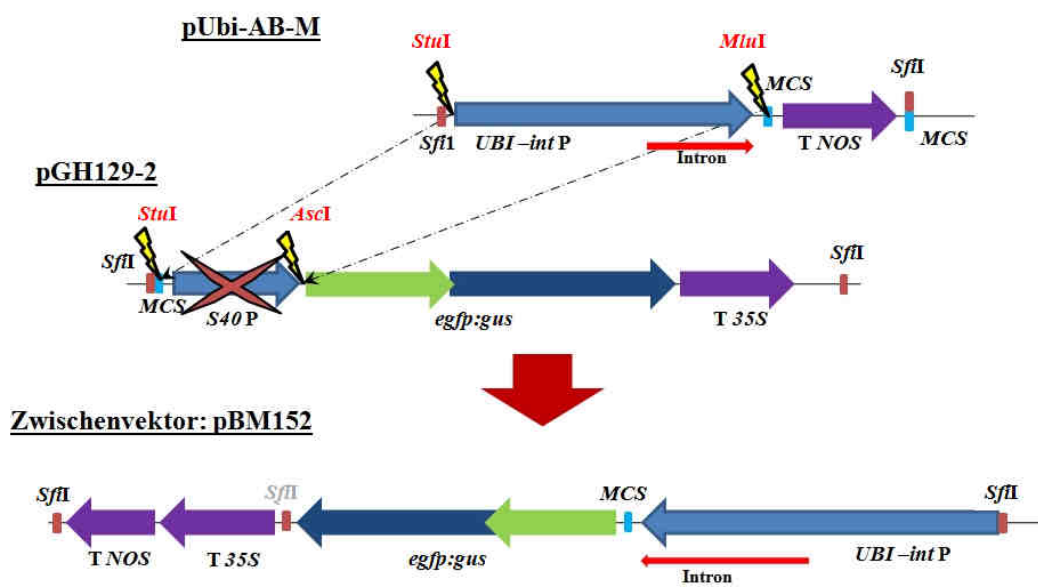


Abbildung 7: Klonierungsplan zur Erstellung des Zwischenvektors pBM152

Schematische Darstellung der Klonierungsschritte mit verwendeten Restriktionsschnittstellen (⚡) und den dazugehörigen Enzymen (rot) *StuI*, *MluI*, *AscI*, *SfiI*. Es sind nur die verwendeten Abschnitte der Vektoren gezeigt. Die genaue Beschreibung der Vektoren befindet sich in Abschnitt 2.1.4. MCS=multiple cloning site, LB=left border, RB=right border, T=Terminator, P=Promotor, *SfiI*=durch Sequenzierung nachträglich entdeckte *SfiI*-Schnittstelle, X=verworfen

## Klonierungsschritt 2: Erstellung des Binärplasmids pBM152

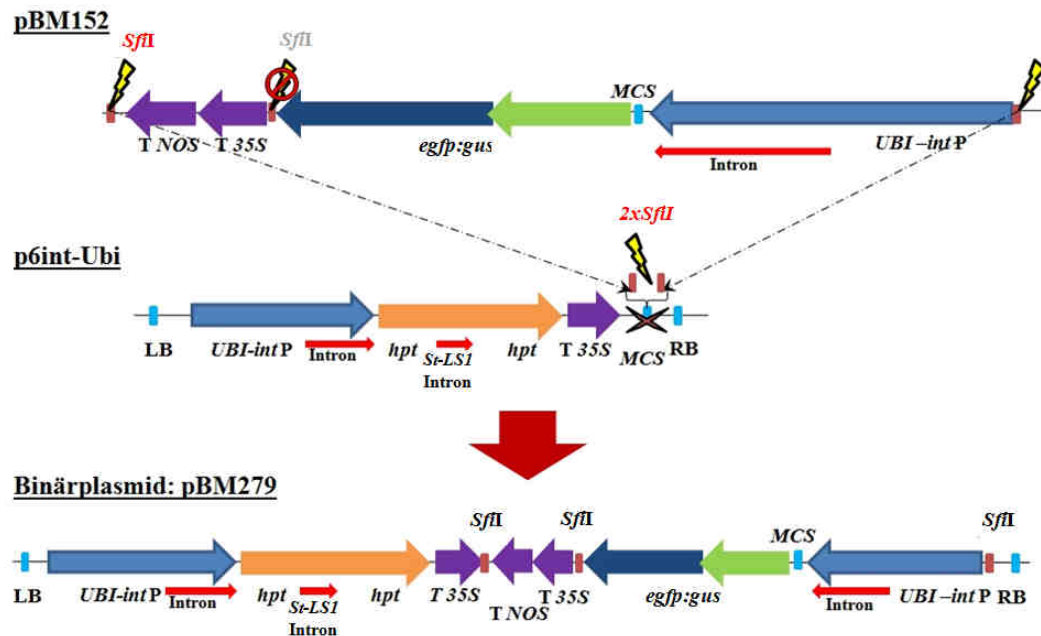
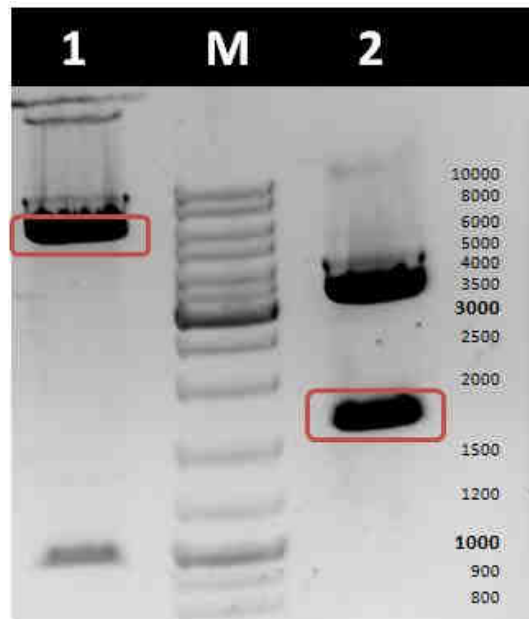


Abbildung 8: Klonierungsplan zur Erstellung des Binärplasmids pBM279

Schematische Darstellung der Klonierungsschritte mit verwendeten Restriktionsschnittstellen (⚡) und den dazugehörigen Enzymen (rot) *Sfi*I. Es sind nur die verwendeten Abschnitte der Vektoren gezeigt. Die genaue Beschreibung der Vektoren befindet sich in Abschnitt 2.1.4. MCS=multiple cloning site, LB=left border, RB=right border, T=Terminator, P=Promotor, *Sfi*I=durch Sequenzierung nachträglich entdeckte *Sfi*I-Schnittstelle, ⓪=Stelle an der keine Restriktion durch *Sfi*I stattfinden soll, ✕=verworfen

### 2.2.1.2.1 Erstellung des Zwischenvektors pBM152

Zuerst wurde das Plasmid pGH129-2 mit *StuI* und *AscI* und pUbi-AB-M mit *StuI* und *MluI* entsprechend der Herstellerangaben gespalten, die Fragmente auf einem Agarosegel aufgetrennt und eluiert (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Restriktionsfragmente von pGH129 und pUbi-AB-M mit Gelelektrophorese aufgetrennt

1=pGH129-2 mit *StuI* und *AscI* gespalten; 2=pUbi-AB-M mit *StuI* und *MluI* gespalten, M=„Generuler DNA Ladder Mix“; Die rot umrandeten Bereiche (1:6028 bp; 2:1556 bp) wurden unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten und weiter verwendet.

Das Grundgerüst (6028 bp) des zu erstellenden Zwischenvektors bildet das Plasmid pGH129 und enthält die Sequenz *egfp:gus* des Fusionsproteins (siehe 2.1.4). Der *40S*-Promotor (946 bp) wurde durch die Restriktion entfernt. Von dem Plasmid pUbi-AB wurde der *UBI-1*-Promotor mit 1.Intron (1556 bp) aus dem Gel eluiert und für die Ligation verwendet. Da das Enzym *StuI* *blunt ends* bildet und diese schwerer zu ligieren sind, wurde bei der Ligation PEG 4000 hinzugefügt, um die Verfügbarkeit des Inserts in der Lösung zu erhöhen. Anschließend wurde das Polymer durch Aufreinigung mit dem „PCR-Purifikation Kit“ wieder entfernt, bevor die Transformation der elektrokompenten *E.coli DH10B*-Zellen damit

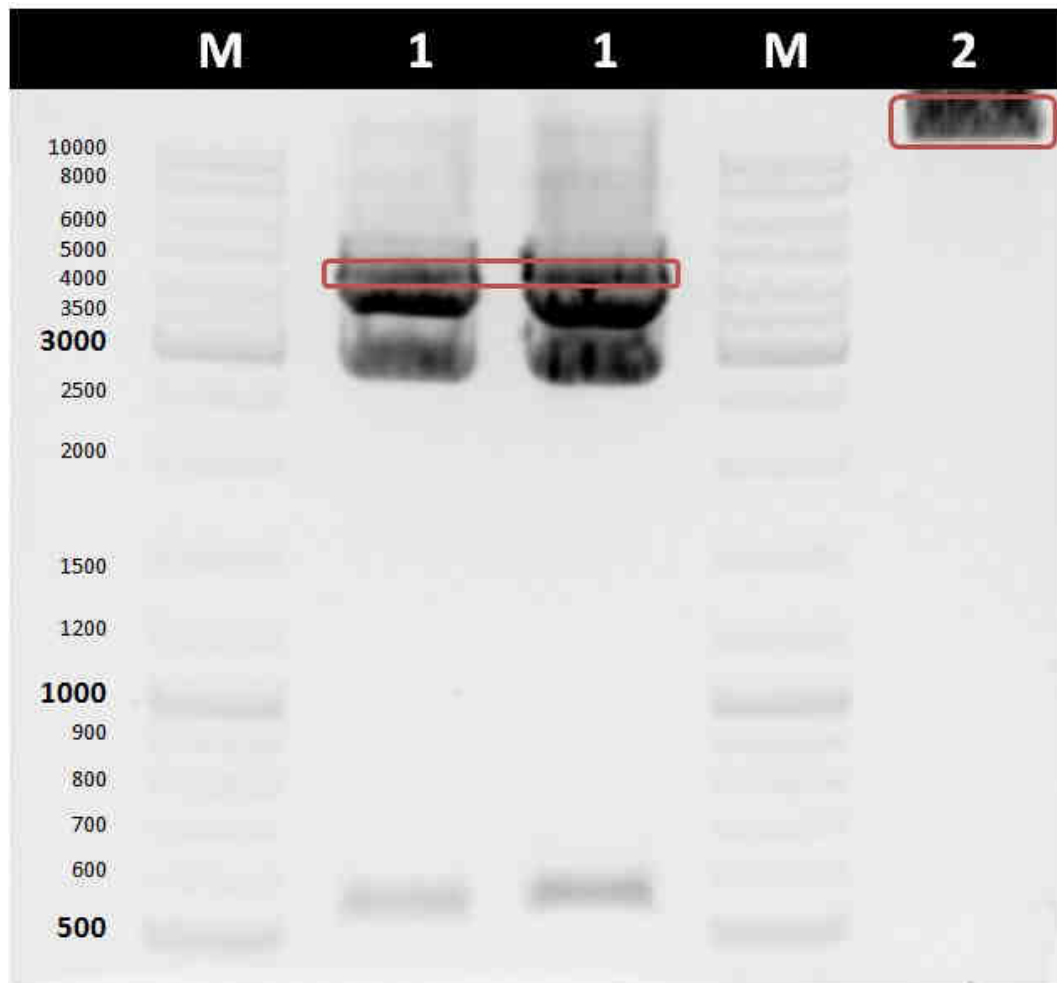
erfolgte, da es hier eine hemmende Wirkung hat. Nach der Selektion auf ampicillinhaltigem Medium wurde von vier zufällig gewählten Einzelkolonien die Plasmid-DNA isoliert und zur Kontrolle mit *EcoRV* gespalten. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte mittels Gelelektrophorese, um festzustellen, ob der gewünschte Vektor (pBM152) in einem der Klone enthalten war. Die veränderten Abschnitte der Plasmid-DNA, mit den entsprechenden Fragmentgrößen, wurden anschließend, mit den Oligonukleotiden GH-NOS-R1 x Bie475 und GH-GFP-F1 x GH-GUS-R1 als Primer (Sequenz siehe 2.1.2), sequenziert.

### **2.2.1.2.2 Überprüfung der Funktionalität des Zwischenvektors pBM152**

Bevor mit dem Zwischenvektor weiter gearbeitet wurde, erfolgte die Überprüfung der Funktionalität des Fusionsproteins und des Promotors. Dafür wurde der Vektor pBM152 mittels Partikelbeschuss von Gerstenembryonen eingebracht und die transiente Expression nach 24 h untersucht. Zuerst erfolgte die Detektion der GFP-Expression am Binokularmikroskop „Leica MZFL“ mit dem Filterset GFP Plant (Leica Mikrosystems, D) und anschließend wurden die Embryonen mit dem GUS-Assay ausgewertet (siehe 2.2.4.2).

### **2.2.1.2.3 Erstellung des Binärplasmids pBM279**

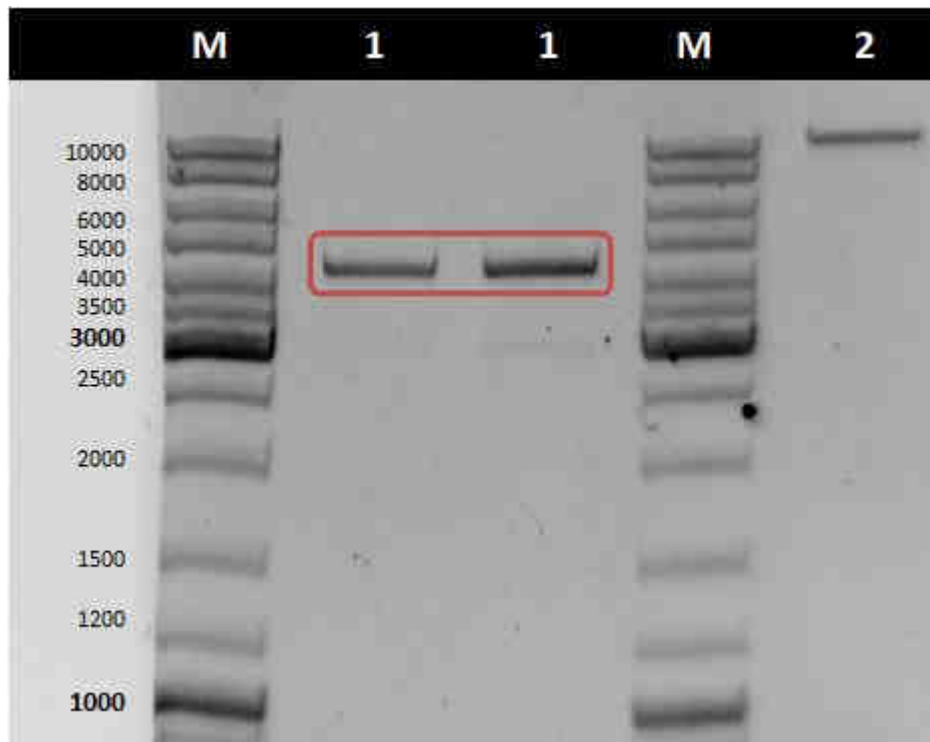
Der zweite Schritt der Klonierung beinhaltete die Integration des Fusionsproteins und dessen *UBI-1*-Promotor und *35S*-Terminator in das Binärplasmid p6int-Ubi. Die Restriktion erfolgte an den *SfiI*-Erkennungssequenzen beider Vektoren. Durch die zusätzlich entdeckte Restriktionsschnittstelle vor dem *35S*-Terminator in pBM152 ist ein partieller Verdau nötig, bei dem das 4686 bp große Fragment isoliert werden muss, welches noch die *35S*-Terminator-Sequenz umfasst. Die Restriktion wurde mit *SfiI* für 2 h bei 37°C statt den optimalen 50°C durchgeführt und danach mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Restriktionsansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt**

**1 = pBM152 partiell mit *Sfi*I gespalten; 2 = p6int-Ubi vollständig mit *Sfi*I gespalten, M = Größenstandard „Generuler DNA Ladder Mix“; Die rot markierten Bereiche (1: 4686 bp; 2: 10618 bp) wurden unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten und weiter verwendet.**

Die Spaltung des p6int-Ubi erfolgte nach Protokoll. Die in der Abbildung umrandeten Fragmente wurden ausgeschnitten, eluiert und zur Überprüfung nochmals 5 µl davon auf dem Gel aufgetragen. Da noch dünne Banden anderer Größe um das Fragment von pBM152 zu erkennen waren (Abbildung 11), wurden die letzten drei Schritte noch einmal wiederholt.



**Abbildung 11:** Eluat der ausgeschnittenen Fragmente (Abbildung 10) mit Gelelektrophorese aufgetrennt.

**Die rot umrandeten Fragmente wurden nochmals eluiert, da noch schwache Banden bei ca. 3000 bp zu erkennen sind.**

Die beiden erhaltenen Fragmente wurden nach Protokoll ligiert. Die Elektroporation von *E.coli DH10B* wurde mit 1,5 µl Ligationsansatz durchgeführt. Die Selektion erfolgte auf LB-Festmedium mit 100 µg/ml Spectinomycin. Es wurde durchschnittlich eine Kolonie pro Kulturplatte erhalten. Die Plasmid-DNA der Klone wurde zur Kontrolle mit *Sfi*I gespalten und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.



## 2.2.2 Pflanzengewebekultur

Alle Arbeitsschritte, außer die Quellung der Körner, wurden unter sterilen Bedingungen an der Reinwerkbank durchgeführt.

### 2.2.2.1 Oberflächensterilisation und Keimung

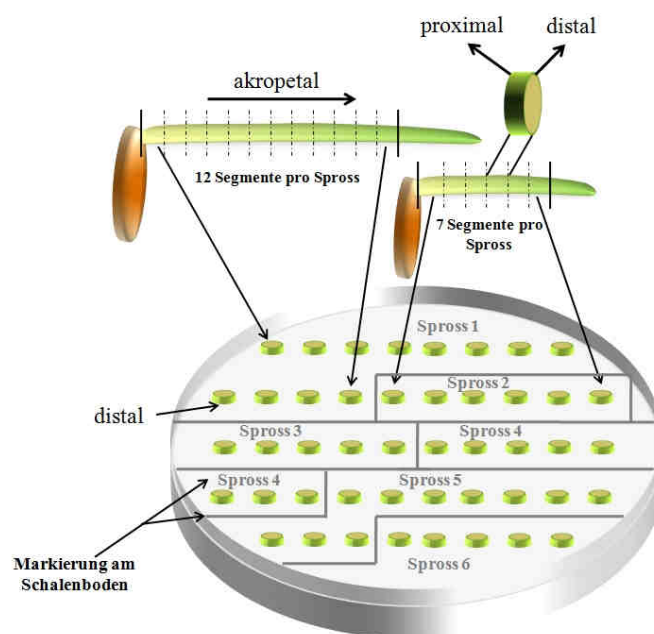
Es wurden auf Grund von Kontaminationsproblemen verschiedene Lösungen zur Oberflächensterilisation (OS) getestet. Es wurden sowohl entspelzte Körner als auch welche mit Spelze verwendet, wobei nur der konkrete Hinweis erfolgt, wenn die Spelze nicht entfernt wurde. Hierfür wurden die Körner (20-66 Stück) von *B.distachyon* (Linie Bd21-3) zuerst 12–24 h in destilliertem Wasser gequollen. Anschließend wurde das Wasser abgegossen, die jeweilige Lösung (siehe Tabelle 2) und 2-3 Tropfen Tween 20<sup>®</sup> (Roth, D) hinzugegeben. Das 15 ml Reaktionsgefäß wurde während der Behandlung gelegentlich geschwenkt und nach Ablauf der Zeit wurde die Lösung verworfen. Es folgten drei Waschschrte mit autoklaviertem ddH<sub>2</sub>O. Zum Schluss wurden die Körner auf Keimmedium (KM) ausgelegt und bei 24°C im Dunkeln inkubiert. Nach 14 Tagen wurden die Keimrate und die Anzahl an kontaminierten Karyopsen bestimmt.

**Tabelle 2: Oberflächensterilisationsvarianten**

<i>Vorbehandlung</i>	<i>Behandlungsdauer</i>	<i>OS-Mittel</i>	<i>Behandlungsdauer</i>
70% Ethanol	3 min	2,4% NaOCl	15 min
ohne		2,4% NaOCl	15 min
70% Ethanol	3 min	6,0% NaOCl	4 min
ohne		6,0% NaOCl	4 min
ohne		6,0% NaOCl	10 min
ohne		0,1% HgCl <sub>2</sub>	5 min
ohne		0,1% HgCl <sub>2</sub>	10 min
ohne		5,0% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 min
ohne		10,0% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 min

### 2.2.2.2 Präparation der Segmente und Kallusinduktion

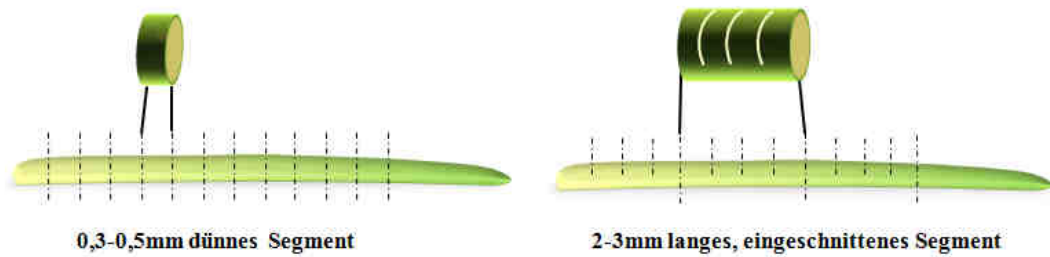
Die Körner (mit/ohne Spelze) wurden anfänglich mit 6% NaOCl für 4 min und später mit 6% NaOCl für 10 min, wie in 2.2.2.1 beschrieben, oberflächensterilisiert. Für die Kallusinduktion wurden Primärsprosse von Keimlingen (im Folgenden als Sprosse bezeichnet) verarbeitet, die ca. 0,8-2,0 cm lang waren (gemessen vom Korn bis zur Spitze der noch geschlossenen Koleoptile). Abbildung 12 zeigt exemplarisch den Versuchsaufbau.



**Abbildung 12: schematischer Versuchsaufbau für die Kallusinduktion**

Die 0,3-0,5 mm dünnen Segmente wurden mit der zur Spitze zeigenden Seite (distal) auf das Kallusinduktionsmedium gelegt. Der Auflagebereich der Segmente eines Sprosses wurde auf dem Schalenboden markiert.

Auf sterilem, mit autoklaviertem Leitungswasser angefeuchteten Filterpapier wurde zuerst der Spross vom Korn abgelöst und anschließend mit einem Skalpell unter dem Stereomikroskop „Stemi 2000-C“ (Carl Zeiss AG, D) in Segmente (Abbildung 13) zerteilt.



**Abbildung 13: abgelöster Spross mit Schnittprofil der verschiedenen Explantatgrößen**

Die Präparation der Explantate erfolgte akropetal an der Karyopse beginnend. Die Anzahl der geschnittenen Segmente variierte je nach Länge des Sprosses. Auf die Verarbeitung des oberen Sprossdrittels wurde später verzichtet, da gezeigt werden konnte, dass dieser Bereich nicht für die Bildung von embryonem Kallus geeignet ist. Die 0,3-0,5 mm dünnen Segmente wurden mit der distalen Schnittfläche auf CIM<sub>B</sub> gelegt, die 2-3 mm großen Segmente wurden axial (auf der Seite) positioniert.

Mit den standardmäßig verwendeten, 0,3-0,5 mm dünnen Explantaten wurden verschiedenen Varianten des Kallusinduktionsmediums (CIM<sub>B</sub>) getestet (Tabelle 3). Die Kulturschalen wurden bei 24°C im Dunkelschrank für 3-4 Wochen inkubiert, anschließend auf frisches Medium transferiert und dort weitere vier Wochen kultiviert.

**Tabelle 3: Medienvarianten und -wechsel während der Kallusinduktion (KI)**

<i>Medium für die ersten 3-4 Wochen KI</i>	<i>Medienwechsel nach 3-4 Wochen KI</i>
CIM <sub>B</sub> + 11,1 µM 2,4-D = CIM <sub>B</sub> (11)	CIM <sub>B</sub> (11)
CIM <sub>B</sub> + 22,2 µM 2,4-D = CIM <sub>B</sub> (22)	CIM <sub>B</sub> (22)
CIM <sub>B</sub> + 40,00 µM 2,4-D = CIM <sub>B</sub> (40)	CIM <sub>B</sub> (40)
CIM <sub>B</sub> (22) + 3 mM Glutamin	CIM <sub>B</sub> (22) + 3 mM Glutamin
CIM <sub>B</sub> (22) mit MS-Salzen inkl. 20,61 mM NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	CIM <sub>B</sub> (22) mit MS-Salzen inkl. 20,61 mM NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
CIM <sub>B</sub> (11)	CIM <sub>B</sub> (5) + 1,00 µM BAP
CIM <sub>B</sub> (11)	CIM <sub>B</sub> (10) + 0,30 µM BAP
CIM <sub>B</sub> (11)	CIM <sub>B</sub> (10) + 1,00 µM BAP

CIM <sub>B</sub> (11)	CIM <sub>B</sub> (10) + 3,00 µM BAP
CIM <sub>B</sub> (11) + 30 g/l Saccharose statt 30 g/l Maltose	CIM <sub>B</sub> (11) + 30 g/l Saccharose statt 30 g/l Maltose
CIM <sub>B</sub> (11) + 3,75 µM CuSO <sub>4</sub>	CIM <sub>B</sub> (11) + 3,75 µM CuSO <sub>4</sub>
CIM <sub>B</sub> (22) + 3,75 µM CuSO <sub>4</sub>	CIM <sub>B</sub> (22) + 3,75 µM CuSO <sub>4</sub>

### 2.2.2.3 Regeneration

Nach 7–8 Wochen Kallusinduktion konnten die gebildeten Kalli, die größer als 3 mm waren, auf K4N-Regenerationsmedium (RM) transferiert werden. Die Anzahl an Kalli, die embryogene Strukturen oder somatische Embryonen besaßen, wurde notiert (eK). Sie wurden täglich für 16 h bei 25°C mit Licht ( $125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und 8 h bei 23°C im Dunkeln inkubiert und nach drei Wochen auf frisches Medium für weitere 28 Tage Kultur gelegt. Danach erfolgte wiederum eine Erfassung aller eK. Nach der siebenwöchigen Regenerationsphase wurde die Anzahl der regenerierenden Kalli (rK) sowie die der gebildeten Regenerate dokumentiert.

#### **2.2.2.4 Identifizierung des regenerierenden Bereiches**

##### **2.2.2.4.1 Visuelle Dokumentation der Kallusentwicklung unterschiedlicher Segmente**

Um nachvollziehen zu können, welcher Bereich Kallus mit embryogenen Strukturen hervorbringen kann, wurden jeweils zwei Sprosse in 0,3–0,5 mm dünne Segmente, 2–3 mm lange, eingeschnittene Segmente geteilt oder im ganzen, eingeschnitten auf CIM<sub>B</sub>(11) im Dunkeln bei 28 °C kultiviert und in regelmäßigen Abständen mit dem Binokular (Leica Mikrosystems, D) und der „AxioCamHrc“ Kamera (Carl Zeiss AG, D) fotografiert und der dazugehörigen Software Axiovision 3.0 verarbeitet. Nach 33 Tagen erfolgte der Transfer auf RM. Die Regenerationsphase erfolgte wie in 2.2.2.3 beschrieben für zwei Wochen.

##### **2.2.2.4.2 Abhängigkeit der Kallusinduktion von der Sprosslänge**

Es wurden 110 Sprosse stichprobenartig von 0,75–3,3 cm Länge vollständig in 0,3–0,5 mm dünne Segmente geteilt, je nach Verfügbarkeit wurden bis zu 9 Sprosse einer Länge bearbeitet, wobei nicht für jede Länge ein Spross gefunden werden konnte. Die Querschnitte wurden vom Sprossursprung (akropetal) aufsteigend nummeriert und auf CIM<sub>B</sub>(11) bei 24°C im Dunkeln inkubiert. Die Position (Segment Nummer x) der embryogenen Kalli wurde für jeden Spross nach fünf Wochen ausgewertet.

##### **2.2.2.4.3 Mikroskopische Untersuchungen**

Für die mikroskopische Untersuchung der Kallusentwicklung unterschiedlicher Segmente wurden die Sprosse, wie in 2.2.2.2 beschrieben, bearbeitet und für sieben Tage auf CIM<sub>B</sub>(11) bei 24°C im Dunkeln kultiviert. Die Fixierung der Segmente und die Aufnahme am Rasterelektronenmikroskop (REM) sowie dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Zeiss LSM 510 Meta, Carl Zeiss AG, D) erfolgte durch T. Rutten (IPK Gatersleben, AG Strukturelle Zellbiologie).

## **2.2.3 Gentransfer in Sprosssegmentkallus mittels *A.tumefaciens***

### **2.2.3.1 Agrobakterienanzucht für die Transformation**

Für Variante 1 und 2a-2c (siehe 2.2.3.2.1-2.2.3.2.2) wurden die Agrobakterien in einer Schüttelkultur über Nacht angezogen. Zehn ml flüssiges MG/L-Medium wurden mit 400 µl Glycerinkultur des hypervirulenten Bakterienstamms *AGL-1* mit dem Binärplasmid pGH-215 angeimpft und bei 28°C und 180 rpm im Schüttler (Inforce HT Minitron, CH) dunkel über Nacht inkubiert. Die optische Dichte wurde am nächsten Tag mit einem Photometer bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) bestimmt und bei Bedarf mit MG/L-Medium auf den gewünschten Wert eingestellt.

Die Agrobakterien für die Transformationsvariante 3 (siehe 2.2.3.2.3) wurden aus einer Glycerinkultur auf MG/L-Festmedium mit 100 mg/l Carbenicillin, 100 mg/l Spectinomycin und 50 mg/l Rifampicin angeimpft und bei 28°C für zwei Tage inkubiert. Anschließend wurde davon eine Kolonie mit der Impföse abgenommen und auf einer frischen Kulturplatte mit Selektion ausgestrichen. Nach zwei Tagen konnte der Bakterienrasen geerntet und in 11 ml Infektionslösung (IL<sub>M</sub>) mit 0,5 mM Acetosyringon in einem 15 ml Falcon (Greiner, D) durch Schütteln suspendiert werden. Die Suspension wurde für 0,5–2 h in einem Erlenmeyerkolben mit Schikane bei 23°C und 180 rpm inkubiert und danach wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 550 nm mit IL<sub>M</sub> auf 0,8 eingestellt.

### **2.2.3.2 *Agrobacterium*-vermittelter Gentransfer**

Für die genetische Transformation mittels *A.tumefaciens* wurden drei verschiedene Protokolle miteinander verglichen. Die Vorkultur der Kalli sowie die Selektion erfolgten auf Kallusinduktionsmedium CIM<sub>B</sub>. Es wurden alle gebildeten Kalli verwendet, die größer als 2 mm waren. Lediglich die Inokulations- und Co-Kulturmedien und die Behandlung mit den Agrobakterien wurden durch die etablierten Transformationsmethoden für Gerstenembryonen (Variante 1) (Hensel *et al.*, 2009), das in Vorversuchen entwickelte Protokoll für *B.distachyon* Sprosssegmentkallus (Variante 2a-c) angelehnt an Vogel und Hill. (2007) und Păcurar *et al.* (2008) oder das von C. Kastner (IPK Gatersleben, AG Pflanzliche Reproduk-

tionsbiologie) optimierte Verfahren für Maisembryonen (Variante 3) (Hensel *et al.*, 2009) ersetzt. Für alle Varianten wurde der hypervirulente *A.tumefaciens*-Stamm *AGL-1* mit dem Binärplasmid pGH-215 (2.1.4) verwendet, welches *sgfp* als Reportergen und *hpt* als Selektionsmarker trägt.

#### 2.2.3.2.1 Anwendung eines modifizierten Protokolls für unreife Gerstenembryonen (Variante 1)

Der Ablauf der Transformationsvariante 1 ist in Abbildung 14 schematisch dargestellt.

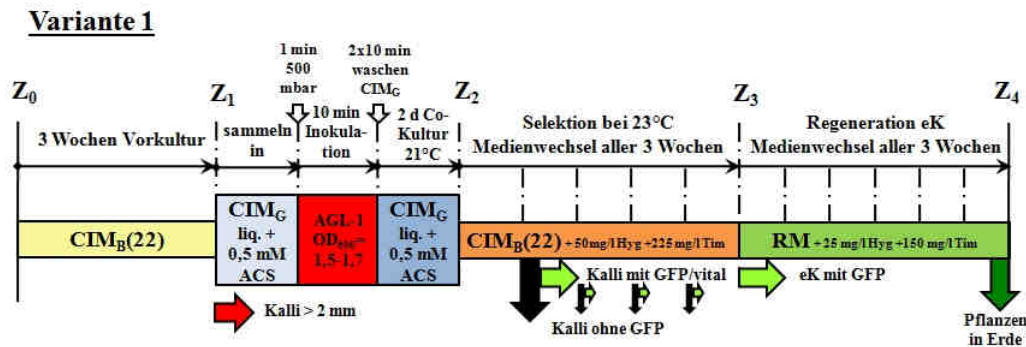


Abbildung 14: Ablaufplan Transformationsvariante 1

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Z<sub>0</sub>-Z<sub>1</sub>= Kallusinduktion der Sprosssegmente, Z<sub>1</sub>-Z<sub>2</sub>= *Agrobacterium*-vermittelte Transformation, Z<sub>2</sub>-Z<sub>3</sub>= Kallusinduktion mit Selektion, Z<sub>3</sub>-Z<sub>4</sub>= Regenerationsphase mit Selektion; CIM<sub>B</sub>(22)= Kallusinduktionsmedium für *B.distachyon*, CIM<sub>G</sub> liq.= flüssiges Inokulationsmedium für Gerste, AGL-1= hypervirulenter *A.tumefaciens*-Stamm mit pGH215, OD<sub>600</sub>=optische Dichte bei 600 nm, RM=Regenerationsmedium, eK= embryogener Kallus, ACS= Acetosyringon, GFP= GFP-Expression im Kallus, Hyg= Hygromycin B, Tim=Timentin, roter Pfeil= für die Transformation verwendet, hellgrüner Pfeil= nach Medienwechsel weiter kultiviert, schwarzer Pfeil= verworfen, dunkelgrüner Pfeil= topfen.

Die geschnittenen Segmente wurden auf CIM<sub>B</sub>(22) drei Wochen vorkultiviert. Die entstandenen Kalli wurden zusammen in einer 6-well-Zellkulturplatte (Greiner, D) (Kalli von einem Spross pro Kavität) mit 3 ml Gersten-Inokulationsmedium (CIM<sub>G</sub>) mit 0,5 mM Acetosyringon pro Kavität gesammelt. Danach wurde das Flüssigmedium abgesaugt und die Kalli mit 300–500 µl Übernachtschüttelkultur Agrobakteriensuspension (OD<sub>600</sub>=1,5–1,7) versetzt. Durch vorsichtiges Schwenken sollte die Suspension gleichmäßig um die Kalli verteilt werden. Die Infiltrati-

on erfolgte 1 min bei 500 mbar durch eine Diaphragmapumpe MP 201 E (Ilmvac, D) im Exsikkator und anschließend 10 min unter Normaldruck. Danach wurde die Bakteriensuspension mit einer Pipette abgesaugt, 3 ml frisches CIM<sub>G</sub> hinzugegeben und für 5–15 min inkubiert. Nach dem Abpipettieren wurde dieser Schritt wiederholt und noch einmal 3 ml frisches CIM<sub>G</sub> mit 0,5 mM Acetosyringon hinzugegeben. Die Kalli wurden darin bei 21°C im Dunkeln co-kultiviert. Nach zwei Tagen wurde das Medium abgesaugt und die Kalli auf festes CIM<sub>B</sub>(22)-Selektionsmedium mit 50 mg/l Hygromycin B und 225 mg/l Timentin gelegt und bei 23°C ohne Licht inkubiert.

#### 2.2.3.2.2 Anwendung eines modifizierten Protokolls für unreife *B.distachyon*-Embryonen (Variante 2a-2c)

##### Variante 2a

Abbildung 15 zeigt schematisch die Abfolge der Herstellung transgener Regenerate aus Sprosssegmenten mit der Variante 2a.

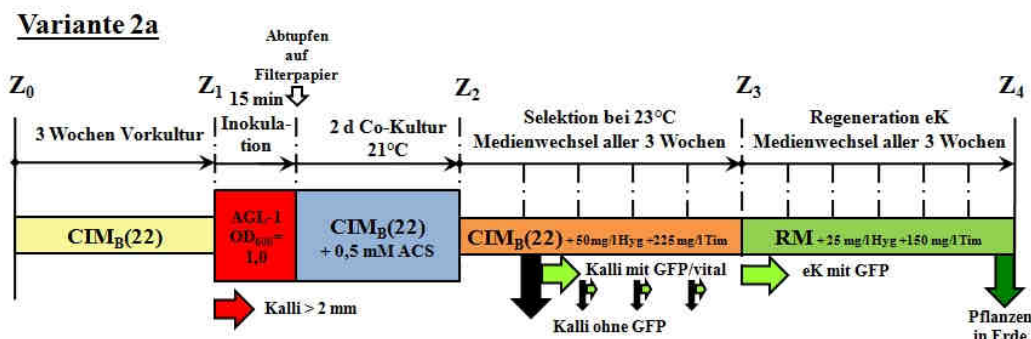


Abbildung 15: Ablaufplan Transformationsvariante 2a

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Z<sub>0</sub>-Z<sub>1</sub>= Kallusinduktion der Sprosssegmente, Z<sub>1</sub>-Z<sub>2</sub>= *Agrobacterium*-vermittelte Transformation, Z<sub>2</sub>-Z<sub>3</sub>= Kallusinduktion mit Selektion, Z<sub>3</sub>-Z<sub>4</sub>= Regenerationsphase mit Selektion; CIM<sub>B</sub>(22)= Kallusinduktionsmedium für *B.distachyon*, AGL-1= hypervirulenter *A.tumefaciens*-Stamm mit pGH215, OD<sub>600</sub>=optische Dichte bei 600 nm, RM=Regenerationsmedium, eK= embryogener Kallus, ACS= Acetosyringon, GFP= GFP-Expression im Kallus, Hyg= Hygromycin B, Tim=Timentin, roter Pfeil= für die Transformation verwendet, hellgrüner Pfeil= nach Medienwechsel weiter kultiviert, schwarzer Pfeil= verworfen, dunkelgrüner Pfeil= topfen.



Die drei Wochen auf CIM<sub>B</sub>(22) vorkultivierten Kalli wurden in einer 24-*well*-Zellkulturplatte (Greiner, D) (Kallus von einem Spross pro Kavität) verteilt, mit 250–300 µl Übernachtschüttelkultur Agrobakteriensuspension (OD<sub>600</sub>=1,0) benetzt und 15 min inokuliert. Danach wurde die Suspension mit einer Pipette abgesaugt und der Kallus auf aschefreiem Filterpapier abgetupft. Die Co-Kultur erfolgte auf festem CIM<sub>B</sub>-Co-Kulturmedium mit 0,5 mM Acetosyringon dunkel bei 21°C für zwei Tage. Danach begann die Selektion auf CIM<sub>B</sub>(22)-Selektionsmedium mit 50 mg/l Hygromycin B und 225 mg/l Timentin bei 23°C ohne Licht.

### **Variante 2b**

Vorkultur und Inokulation erfolgten wie bei Variante 2a (Abbildung 15) nur mit einer OD<sub>600</sub>=1,7-2,0. Nach der Inokulation wurden die Kalli zudem zweimal mit 1,5 ml autoklaviertem H<sub>2</sub>O für 15 min. gespült. Die Co-Kultur und anschließende Selektion wurden nach dem Abtupfen der Kalli auf Filterpapier, wie bei 2.2.3.2.2 beschrieben, durchgeführt.

### **Variante 2c**

Bei dieser modifizierten Methode wurden die Segmente 4-5 Wochen auf CIM<sub>B</sub>(11) vorkultiviert. Die Inokulation mit der Agrobakteriensuspension (OD<sub>600</sub>=0,6) erfolgte in einem 6 ml Kryo-Röhrchen (Greiner, D). Die Kalli aller Sprosse wurden hineingegeben und bis ca. 9/10 Volumen mit Agrobakteriensuspension aufgefüllt. Die Infiltration erfolgte 1 min bei 500 mbar durch eine Diaphragmapumpe MP 201 E (Ilmvac, D) im Exsikkator und anschließend wurde die Inokulation 10 min unter Normaldruck bei gelegentlichem Invertieren fortgeführt. Danach wurde die Suspension dekantiert und die Kalli auf aschefreiem Filterpapier abgetupft. Die weitere Behandlung erfolgte äquivalent zu Variante 2a (siehe Abbildung 15).

### 2.2.3.2.3 Anwendung eines modifizierten Protokolls für unreife Maisembryonen (Variante 3)

Abbildung 16 veranschaulicht das Transformationssystem der Variante 3.

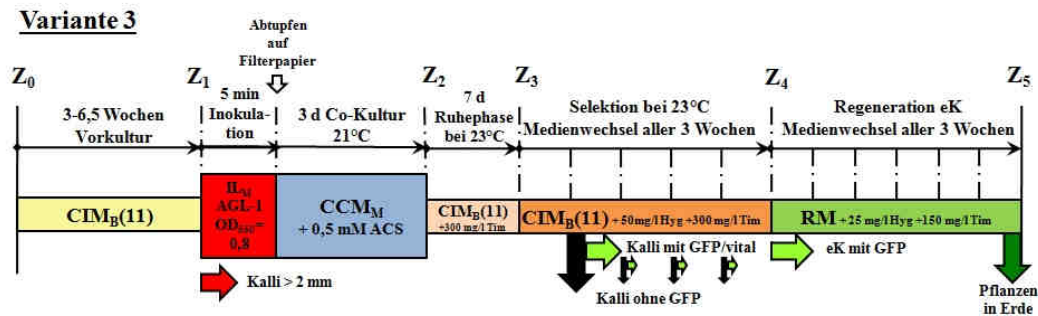


Abbildung 16: Ablaufplan Transformationsvariante 3

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Z<sub>0</sub>-Z<sub>1</sub>= Kallusinduktion der Sprosssegmente, Z<sub>1</sub>-Z<sub>2</sub>= *Agrobacterium*-vermittelte Transformation, Z<sub>2</sub>-Z<sub>3</sub>= Ruhephase ohne Selektion, Z<sub>3</sub>-Z<sub>4</sub>= Kallusinduktion mit Selektion Z<sub>4</sub>-Z<sub>5</sub>= Regenerationsphase mit Selektion; CIM<sub>B</sub>(11)= Kallusinduktionsmedium für *B.distachyon*, IL<sub>M</sub>= Infektionslösung für Mais, AGL-1= hypervirulenter *A.tumefaciens*-Stamm mit pGH215, OD<sub>550</sub>=optische Dichte bei 550 nm, CCM<sub>M</sub>=Co-Kulturmedium für Mais, RM=Regenerationsmedium, eK= embryogener Kallus, ACS= Acetosyringon, GFP= GFP-Expression im Kallus, Hyg= Hygromycin B, Tim=Timentin, roter Pfeil= für die Transformation verwendet, hellgrüner Pfeil= nach Medienwechsel weiter kultiviert, schwarzer Pfeil= verworfen, dunkelgrüner Pfeil= topfen.

Die Kalli der geschnittenen Segmente wurden nach 3-6,5 Wochen Vorkultur auf CIM<sub>B</sub>(11) in 6 ml Kryo-Röhrchen (Greiner, D) gesammelt (ca. 30/Röhrchen) und mit jeweils ca. 1–2 ml Suspension, aus Infektionslösung und Agrobakterien (OD<sub>550</sub>= 0,8), gefüllt. Die Röhrchen wurden mehrmals langsam invertiert. Nach 5 min. Inokulation wurde alles auf 7–10 Lagen sterilem, aschefreiem Filterpapier gegossen, leicht abgetupft und der Kallus auf festes Mais-Co-Kulturmedium mit 0,5 mM Acetosyringon gelegt. Nach drei Tagen Co-Kultur bei 21°C im Dunkeln erfolgte der Transfer auf CIM<sub>B</sub>(11) ohne Hygromycin und mit 300 mg/l Timentin. Nach weiteren sieben Tagen wurde der Kallus auf CIM<sub>B</sub>(11)-Selektionsmedium mit 50 mg/l Hygromycin B und 300 mg/l Timentin transferiert und bei 23°C im Dunkeln weiter kultiviert.

### 2.2.3.3 Selektion und Regeneration

Die weitere Selektion erfolgte für alle Varianten nach drei Wochen auf frischem CIM<sub>B</sub> mit 50 mg/l Hygromycin B und 300 mg/l Timentin bei 24°C im Dunkeln. Der Medienwechsel wurde alle 21 Tage vorgenommen. Dabei wurden nur die Kalli mitgeführt, die entweder eine GFP-Expression unter UV-Licht aufwiesen oder noch vital aussahen. Die Anzahl der GFP-exprimierenden Kalli wurde mit dem Binokularmikroskop „Leica MZFL“ und dem Filterset GFP Plant (Leica Mikrosystems, D) überprüft und notiert, wobei kein Unterschied zwischen flächigem und punktuelltem Signal und dem Aussehen der Kalli gemacht wurde. Sobald ein Kallus somatische Embryonen ausbildete, wurde er auf RM mit 25 mg/l Hygromycin B und 150 mg/l Timentin transferiert und bei 16 h Licht ( $125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )/Tag mit 25°C und bei 23°C in der Dunkelphase inkubiert. Die Subkultivierung wurde alle drei Wochen vorgenommen und mehrmals wiederholt. Kleine regenerierte Pflanzen wurden ab circa 0,5 cm Höhe in *in vitro* Container (Greiner, D) mit RM (25 mg/l Hygromycin B und 150 mg/l Timentin) überführt. Dieser Vorgang wurde bis zu 17 Wochen nach der Transformation durchgeführt und dann abgebrochen. Die Regenerate wurden, sobald sie Wurzel und Spross besaßen, in Erde gebracht (siehe 2.1.1).

### 2.2.3.4 Nachweis der GFP-Expression in den regenerierten Pflänzchen

Den Pflänzchen wurden junge Blätter abgenommen und die Lokalisation des gebildeten GFP in den Frischpräparaten, mit Hilfe eines Konfokalen Laser Scanning-Mikroskops (Zeiss LSM 510 Meta, Carl Zeiss AG, D) durch T. Rutten (IPK Gatersleben, AG Strukturelle Zellbiologie), untersucht. Das GFP-Protein ( $E_{\text{max}} = 512 \text{ nm}$ ) wurde mit einer Laser-Linie von 488 nm angeregt und die Emission mit einem Bandpass-Filter von 505-530 nm detektiert. Die Authentizität des Fluoreszenzsignals wurde durch eine photospektrometrische Analyse mit dem Meta-Detektor bestätigt. Für die Darstellung von Chlorophyll wurde die Probe mit einer Laser-Linie von 488 nm angeregt und die rote Autofluoreszenz von Chlorophyll ( $E_{\text{max}} = 680 \text{ nm}$ ) mit einem Langpass-Filter von 650 nm gemessen.

## 2.2.4 Molekularbiologische Arbeiten

Das Saatgut der aus Transformationsvorversuchen gewonnenen Pflanzen wurde ausgesät (siehe 2.1.1) und die Pflanzen bezüglich ihrer Transgenität untersucht. Die T<sub>0</sub>-Generation wurde durch den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer nach Variante 2a gewonnen (2.2.3.2.2). Der hypervirulente Agrobakterienstamm LBA4404/pSB1 (Komari *et al.*, 1996) trug den Binärvektor pTwin GUS+HPT:GFP von E. Kapusi (IPK Gatersleben, D) (Abbildung 17) und bot somit die Möglichkeit, das *sgfp*-Gen gekoppelt mit dem *HPT*-Gen und unabhängig davon das *gus*-Gen zu übertragen.

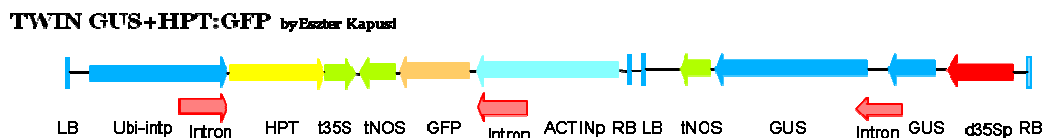


Abbildung 17: T-DNAs des Binärvektors pTwin GUS+HPT:GFP

Die angezogenen Pflanzen wurden auf alle drei Reportergene getestet. Der Nachweis wurde auf unterschiedlichen Wegen (Hygromycin-Blatt-Test, GUS-Assay, PCR und Southern-Blot) an jeweils 15 Individuen der T<sub>1</sub>-Generation von vier Primärtransgenen geführt und somit zusätzlich die Segregation ermittelt.

### 2.2.4.1 Nachweis der Hygromycinresistenz in Blattsegmenten (HYG-Test)

Für den Hygromycin-Blatt-Test wurde jeweils ein junges Blattmittelstück von der Pflanze abgeschnitten und bis zur Hälfte in 2 ml flüssiges MS-Medium mit 200 mg/l Hygromycin B und 0,1% (v/v) Tween 20<sup>®</sup> getaucht. Die dafür verwendete 96er *deep-well*-Platte wurde locker mit Adhäsionsfolie umwickelt und bei 21°C für sieben Tage mit 16 h Licht (150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) pro Tag inkubiert. Anschließend wurden die Segmente aus dem Medium genommen und die Hygromycin-resistenten Individuen identifiziert.

### 2.2.4.2 Histochemischer Nachweis der *gus*-Expression (GUS-Assay)

Die Untersuchung auf vorhandene *gus*-Expression erfolgte durch den colorimetrischen Nachweis. Die Blatt- und Wurzelgewebeprobe wurden mit 1,5 ml X-Gluc-Lösung in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und für einen Tag bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit abgesaugt und durch 96%igen (v/v) Ethanol ersetzt und 2–3 h bei 60°C in einem Wasserbad inkubiert, um das Chlorophyll aus den Blättern zu lösen. Danach wurde das Ethanol verworfen und durch frisches ersetzt. Anschließend wurden die Proben nach blau gefärbten Gewebebereichen oder Zellen untersucht.

### 2.2.4.3 Isolierung genomischer DNA

Für die DNA-Isolierung wurden zweimal 2 cm lange, junge Blätter von der Pflanze abgenommen und in einem 2 ml Save-Lock Reaktionsgefäß (Eppendorf, D) mit Stahlkugel (Ø 4 mm) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Blattmaterial wurde mit einer Schwingmühle (Retsch, D) 2 min bei 1,62 kHz zerkleinert und vor dem Auftauen mit 800 µl Extraktionspuffer versetzt. Die Proben wurden bis zur vollständigen Suspension gevortext. Anschließend wurden 800 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugegeben und wiederum 2 min gevortext. Danach fand eine Zentrifugation für 3 min bei 5.000 rpm und Raumtemperatur statt. Der entstandene Überstand wurde mit einer Pipette abgesaugt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Zugabe von 80 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 800 µl Isopropanol. Die Reaktionsgefäße wurden geschwenkt bis die Konzentrationsschlieren verschwanden und die DNA bei 13.000 rpm für 10 min bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert, verworfen und 800 µl 70%iger (v/v) Ethanol zum Pellet gegeben, mehrfach invertiert und erneut bei 13.000 rpm für 5 min bei 4°C pelletiert. Danach wurde das Ethanol erneut verworfen und das Pellet für ca. 30 min luftgetrocknet. Die DNA wurde mit 100 µl R40 (40 µg/ml RNase in TE, pH 8) resuspendiert, bei 37°C 1 h inkubiert und danach bei 4°C gelagert. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm.

#### 2.2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion und Gelelektrophorese

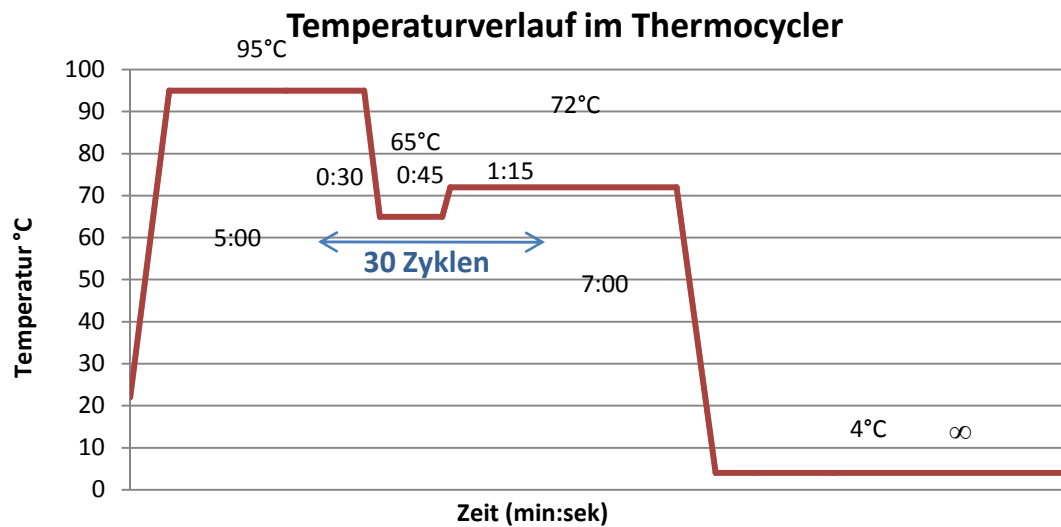
Mittels der PCR sollte der Nachweis der *HPT*-Gensequenz erbracht werden. Hierfür wurde genomische DNA aus den jungen Blättern der T<sub>1</sub>-Generation verwendet (siehe 2.2.4.3). Es wurden die Oligonukleotide GH-HYG-F1 x GH-HYG-R2 in der PCR verwendet (Sequenz siehe 2.1.2). Deren Basen binden spezifisch im *HPT*-Gen und bilden bei der PCR-Reaktion im Thermocycler ein 707 bp großes Fragment. Der PCR-Ansatz für eine Probe setzt sich wie folgt zusammen (Tabelle 4).

**Tabelle 4 PCR-Mix**

<i>Reagenz</i>	<i>Volumen [µl]</i>
H <sub>2</sub> O (DNase und RNase frei)	13,20
5 x GoTaq Green Flexi Puffer (Fermentas, D)	4,00
<i>forward</i> Primer (10 pM)	0,20
<i>reverse</i> Primer (10 pM)	0,20
MgCl <sub>2</sub> (25 mM) (Fermentas, D)	1,12
dNTP's (10 mM) (Fermentas, D)	0,20
Genomische DNA (20 ng/µl)	1,00
GoTaq DNA-Polymerase (5 u/µl) (Fermentas, D)	0,08
Endvolumen	20,00

Die Proben wurden auf Eis pipettiert und die PCR mit folgendem Programm im Thermocycler durchgeführt (Diagramm 1).

Die gelelektrophoretische Trennung erfolgte für 45 min bei 200 V auf einem 0,8%-igem (w/v) Agarosegel in 0,5 x TBE Laufpuffer. Durch Zugabe von 0,12 mg Ethidiumbromid zu 400 ml Gel konnte die DNA mit UV-Licht mit dem *Image-Master VDS Gel Documentation System* (Pharmacia Biotech, USA) sichtbar gemacht und das Ergebnis als Bilddatei dokumentiert werden. Als Größenstandard diente die „100 bp DNA Ladder“ von Fermentas (D).



**Diagramm 1: PCR-Programm des Thermocyclers für die Amplifikation des *HPT*-Gens**

#### 2.2.4.5 DNA-Gel-Blot-Analyse

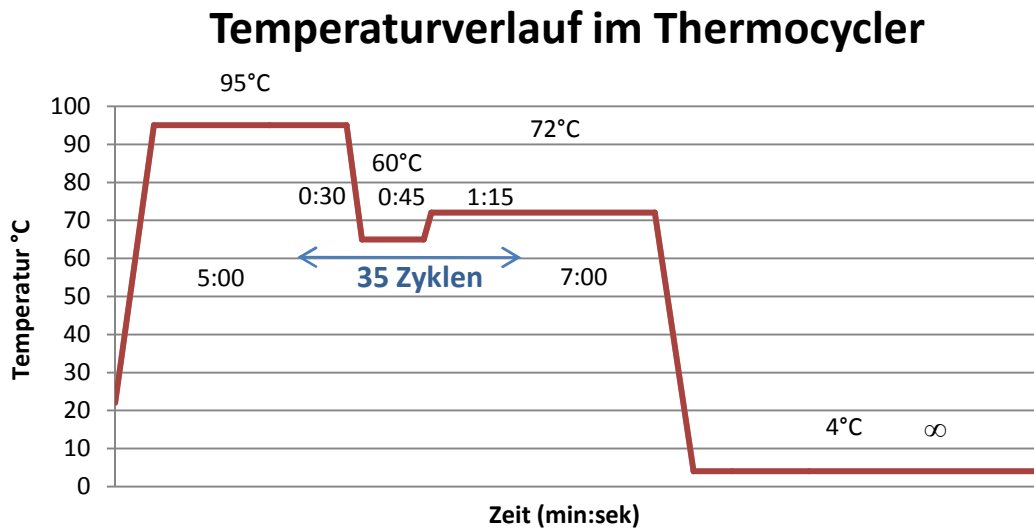
##### 2.2.4.5.1 Digoxigenin (DIG)–Sonden Synthese

Die *GFP*-Hybridisierungssonden wurden mit dem „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ von Roche (D) nach Anleitung des Herstellers erstellt (Stand 2008). Als *template* diente das Binärplasmid pGH-215, was die Sequenz für *GFP* trägt. Als Primer wurden pGH-GFP-F1 und pGH-GFP-R2 verwendet. Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen (Tabelle 5).

**Tabelle 5: PCR-Ansatz für DIG-Sonden Synthese mit „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ von Roche (D)**

<i>Reagenz</i>	<i>Volumen [μl]</i>
H <sub>2</sub> O (DNase und RNase frei)	33,25
PCR-Puffer mit MgCl <sub>2</sub>	5,00
PCR DIG Probe Synthesis Mix (Roche, D)	5,00
<i>forward</i> Primer	5,00
<i>reverse</i> Primer	5,00
Enzymmix (Roche, D)	0,75
Template DNA (pGH-215) (10-100 pg/μl)	1,00
Endvolumen	50,00

Für die Negativkontrolle wurde statt dem „PCR DIG Probe Synthesis Mix“ 5 µl dNTP-Stocklösung hinzugegeben. Der Temperaturverlauf im Thermocycler ist in Diagramm 2 dargestellt.



**Diagramm 2 PCR-Programm des Thermocyclers für die DIG-Sonden-Synthese**

Von den insgesamt 50 µl Ansatz wurden nach der PCR 5 µl mit 2 µl Blaumarker und 13 µl ddH<sub>2</sub>O auf dem 0,8%-igem (w/v) Agarosegel aufgetragen und wie unter 2.2.4.4 beschrieben zur Kontrolle gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Rest der Proben wurde bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

#### **2.2.4.5.2 Restriktion genomischer DNA mit *HinDIII* und gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente**

Die von frischem Blattmaterial isolierte genomische DNA (2.2.4.3) wurde mit *HinDIII* (Fermentas, D) nach Herstellerangaben 12 h gespalten. *HinDIII* schneidet sequenzspezifisch genau einmal in der T-DNA nach dem *sgfp* (Abbildung 17). Für die Plasmidkontrolle wurde der pTwin GUS+HPT:GFP verwendet. Die Restriktionsansätze setzten sich, wie in Tabelle 6 und Tabelle 7 gezeigt, zusammen. Die enzymatische Spaltung fand bei 37°C über Nacht statt.



**Tabelle 6: Restriktionsansatz für genomische DNA**

<i>Reagenz</i>	<i>Volumen [<math>\mu</math>l]</i>
ddH <sub>2</sub> O(DNase und RNase frei)	10
Puffer rot (Fermentas, D)	5
Enzym ( <i>HinDIII</i> )	5
Genomische DNA (1-2 $\mu$ g/ $\mu$ l)	30
Endvolumen	50

**Tabelle 7: Restriktionsansatz für Plasmidkontrolle**

<i>Reagenz</i>	<i>Volumen [<math>\mu</math>l]</i>
ddH <sub>2</sub> O(DNase und RNase frei)	25
Puffer rot (Fermentas, D)	5
Enzym ( <i>HinDIII</i> )	5
Plasmid DNA (1-2 $\mu$ g/ $\mu$ l)	15
Endvolumen	30

Durch Inkubation bei 50°C für 1 min wurde das Enzym inaktiviert. Für die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente wurden zu den 50  $\mu$ l Restriktionsansatz 6  $\mu$ l Blaumarker hinzugegeben, alles kurz gevortext und abzentrifugiert. Danach wurden die Proben auf Eis gelagert bis sie in die Taschen eines 0,8%-igen (w/v) Agarosegels pipettiert wurden. Neben der genomischen DNA der potentiellen Transformanten und des Wildtyps wurde die Plasmidkontrolle sowie 4  $\mu$ l „DIG-Marker“ (Roche, D) aufgetragen. Die Auftrennung fand horizontal für 1 h bei 100 V statt und wurde danach für 23 h auf 20 V fortgesetzt. Anschließend wurde das Gel für 15 min mit 0,25 M HCl und danach mit ddH<sub>2</sub>O gespült. Es folgten zweimal 15 min Inkubation in Denaturierungspuffer, ein Waschschritt mit ddH<sub>2</sub>O, zweimal 15 min Inkubation in Neutralisationspuffer und abschließend noch 10 min in 20xSSC. Alle Waschschritte wurden in Kunststoffschalen auf einem Wippschüttler (GFL, D) bei leichtem Schwenken (37,5/min) durchgeführt.

#### 2.2.4.5.3 Immobilisation aufgetrennter genomischer DNA auf einer Membran

Die „Nitrان N Blotting-Membran“ (Whatman, D) wurde 10 min in ddH<sub>2</sub>O inkubiert und danach in 20xSSC für 20 min geschwenkt. Der Aufbau des „TurboBlotter™ Systems“ von Whatman erfolgte nach Abbildung 18.



**Abbildung 18: TurboBlotter-Aufbau nach Whatman (Whatman, 2009)**

Der Transfer erfolgte über Nacht mit 20xSSC als Laufpuffer. Abschließend wurde die DNA auf der Membran durch Inkubation für 30 s im *Crosslinker* (Peqlab, D) mit 1200 µJoule/min kovalent gebunden.

#### 2.2.4.5.4 Hybridisierung einer genspezifischen DNA-Sonde mit genomischer DNA

Die Membran wurde mit der DNA-Seite nach innen zeigend in eine Hybridisierungsröhre gelegt und mit 50°C vorgewärmten „DIG-EasyHyb Puffer“ (Roche, D) überschichtet. Die Röhren wurden bei 50°C für 3 h in einem Hybridisierungsofen (HB-1D, Techne, USA) bei ständiger Rotation inkubiert.

Die hergestellten DIG-Sonden wurden bei 100°C in einem Wasserbad denaturiert und auf Eis gelagert, 45 µl Sondenlösung wurde zu 22,5 ml 50°C warmem „DIG-EasyHyb Puffer“ gegeben und gegen den „DIG-EasyHyb Puffer“ aus der Vor-hybridisierung ausgetauscht. Die Membranen in den Hybridisierungsröhren wurden über Nacht bei 50°C hybridisiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen mit zweimal 2xSSC + 0,1% (w/v) SDS bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend folgten zwei 15-minütige Waschschrte mit 0,1xSSC + 0,1% (w/v) SDS bei 68°C unter ständigem Rotieren.

### 2.2.4.5.5 Nachweis der Hybridisierung

Auch hier erfolgten alle Waschschrte unter Schwenken und mit sauberen Kunststoffschalen nach jedem Schritt. Zuerst wurde für 5 min DIG-Waschpuffer (Roche, D) hinzugegeben, danach mit 100 ml Blocking-Lösung (Roche, D) für 1-2 h geschwenkt und anschließend 5 µl Antikörper („anti-DIG-FAB-Fragmente“, Roche, D) in 50 ml Blocking-Lösung gemischt und die Membran für exakt 30 min damit inkubiert. Es folgten zweimal 15 min mit DIG-Waschpuffer und 5 min in 40 ml Detektionspuffer. Anschließend wurde die Membran, mit der DNA-Seite nach oben zeigend, in eine saubere Klarsichtfolie gelegt und 2 ml „CSPD *ready to use*“ (Roche, D) gleichmäßig darauf verteilt. Eingeschlossene Luftblasen wurden entfernt und es erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min. Danach wurde die überschüssige Flüssigkeit herausgestrichen und die Membran in einer verschließbaren Klarsichthülle für 10 min bei 37°C inkubiert.

In einer Dunkelkammer wurde ein Chemilumineszenzfilm (Amersham Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL, Amersham Biosciences, UK) auf die Membran gelegt und für 30 min belichtet. Die Entwicklung des Filmes erfolgte so lange im Entwickler, bis die Banden gut zu erkennen waren. Danach wurde die Reaktion durch Spülen mit H<sub>2</sub>O gestoppt und anschließend der Film für 5 min in der Fixierlösung inkubiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Klonierungsarbeiten

Ziel dieses Teils der Arbeit war die Erstellung eines Binärplasmids, welches die Reportergensequenz für das Fusionsprotein *egfp:gus* und *hpt* als Selektionsmarker mit *St-LSI*-Intron trägt. Beide Gene sollten jeweils unter der Kontrolle eines *UBI-I*-Promotors mit 1. Intron und eines 35S-Terminators stehen.

Die Klonierung des Binärplasmids pBM279 erfolgte in zwei Klonierungsschritten. Der erste Schritt beinhaltete den Austausch des 40S-Promotors vor dem *egfp:gus* in pGH129-2 durch den *UBI-I*-Promotor mit 1. Intron aus pUbi-AB-M. In Abbildung 19 ist das Ergebnis der Kontrollrestriktion der Plasmid-DNA der selektierten Klone nach Transformation des Ligationsproduktes dargestellt.

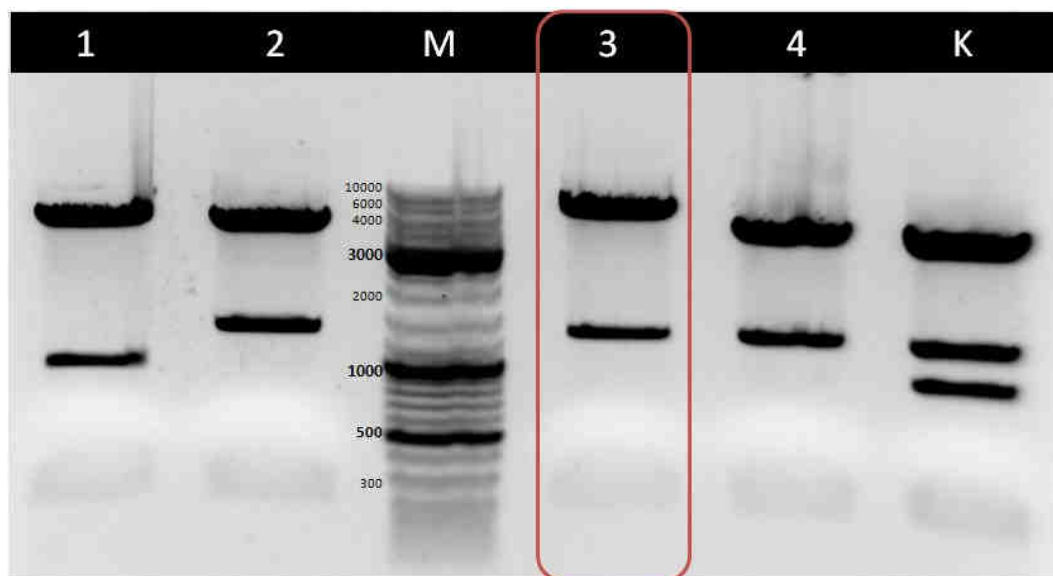
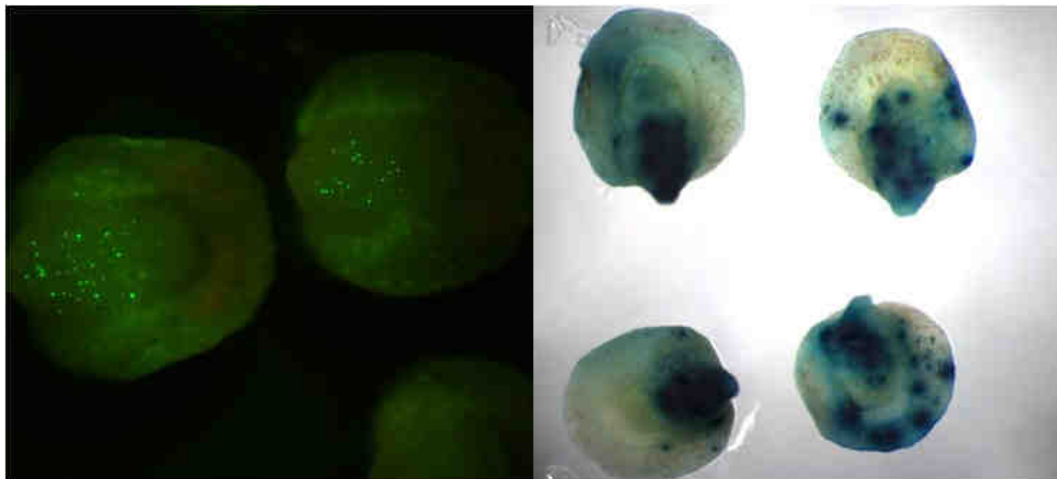


Abbildung 19: Kontrollrestriktion der Plasmid-DNA von pBM152 mit *EcoRV*

Fragmente der Plasmid-DNA der erhaltenen Klone (1-4) aus der Transformation mit dem Ligationsprodukt aus Abbildung 9 (rot markierte Fragmente); M = Größenstandard „Generuler DNA Ladder Mix“, K = Kontrolle pGH129-2; Der rot markierte Klon besitzt die gesuchten Fragmentgrößen 6063 bp, 1290 bp und 231 bp.

Die Plasmid-DNA der Kolonie 3 zeigte das erwünschte Restriktionsergebnis. Die Fragmentgrößen entsprachen denen des gesuchten Vektors woraufhin die Plasmid-DNA mit den Oligonukleotiden GH-GFP-F1 x GH-GUS-R1 und GH-Nos-R1 x Bie475 zur Sequenzierung gegeben wurde. Die partielle Überprüfung der Plasmidsequenz bestätigte, dass der *UBI*-1-Promotor und sein Intron zusammen mit der Rückgratsequenz des pGH129-2 ligiert worden waren. Allerdings wurde auch festgestellt, dass sich eine weitere bisher unbekannte *Sfi*I-Schnittstelle zwischen der *egfp:gus*-Sequenz und dem 35S-Terminator befindet, was im folgenden Klonierungsschritt einen partiellen Verdau notwendig machte.

Die Verifikation der Vektorfunktionalität erfolgte durch den Beschuss von Gerstenembryonen mit Goldpartikeln, die mit dem Zwischenvektor pBM152 beschichtet wurden. Die transiente Expression beider Teile des Fusionsproteins wurde getestet. In Abbildung 20 ist zu erkennen, dass sowohl Zellen mit grüner Fluoreszenz als auch welche mit der typischen Blaufärbung, die durch die X-Gluc-Hydrolyse und anschließende Oxidation des Reaktionsproduktes entsteht, in den Embryonen auftreten.



**Abbildung 20: GFP- und GUS-Nachweis in Gerstenembryonen**

**Aufnahme nach Partikelbeschuss mit pBM152; links: Expression der GFP:GUS-Fusionsproteins unter UV-Licht; rechts: histochemischer GUS-Assay**

Im zweiten Klonierungsschritt sollte die erstellte Expressionskassette, bestehend aus *egfp:gus* mit dem *Ubi-1*-Promotor und dem *35S*-Terminator, durch partielle Restriktion mit dem Enzym *Sfi*I aus dem Zwischenvektor isoliert werden. Anschließend sollte diese in den geöffneten Binärvektor p6int-Ubi ligiert werden, der u.a. eine Selektionsmarkerkassette (*hpt*) und den Replikationsursprung des Plasmids für *A.tumefaciens* enthält. Die partielle Spaltung und Eluierung der Fragmente konnte erfolgreich durchgeführt werden, allerdings wurde keine Kolonie mit dem gesuchten Vektor pBM279 durch Kontrollrestriktion mit *Sfi*I identifiziert. Lediglich der Ausgangsvektor p6int-Ubi konnte nachgewiesen werden

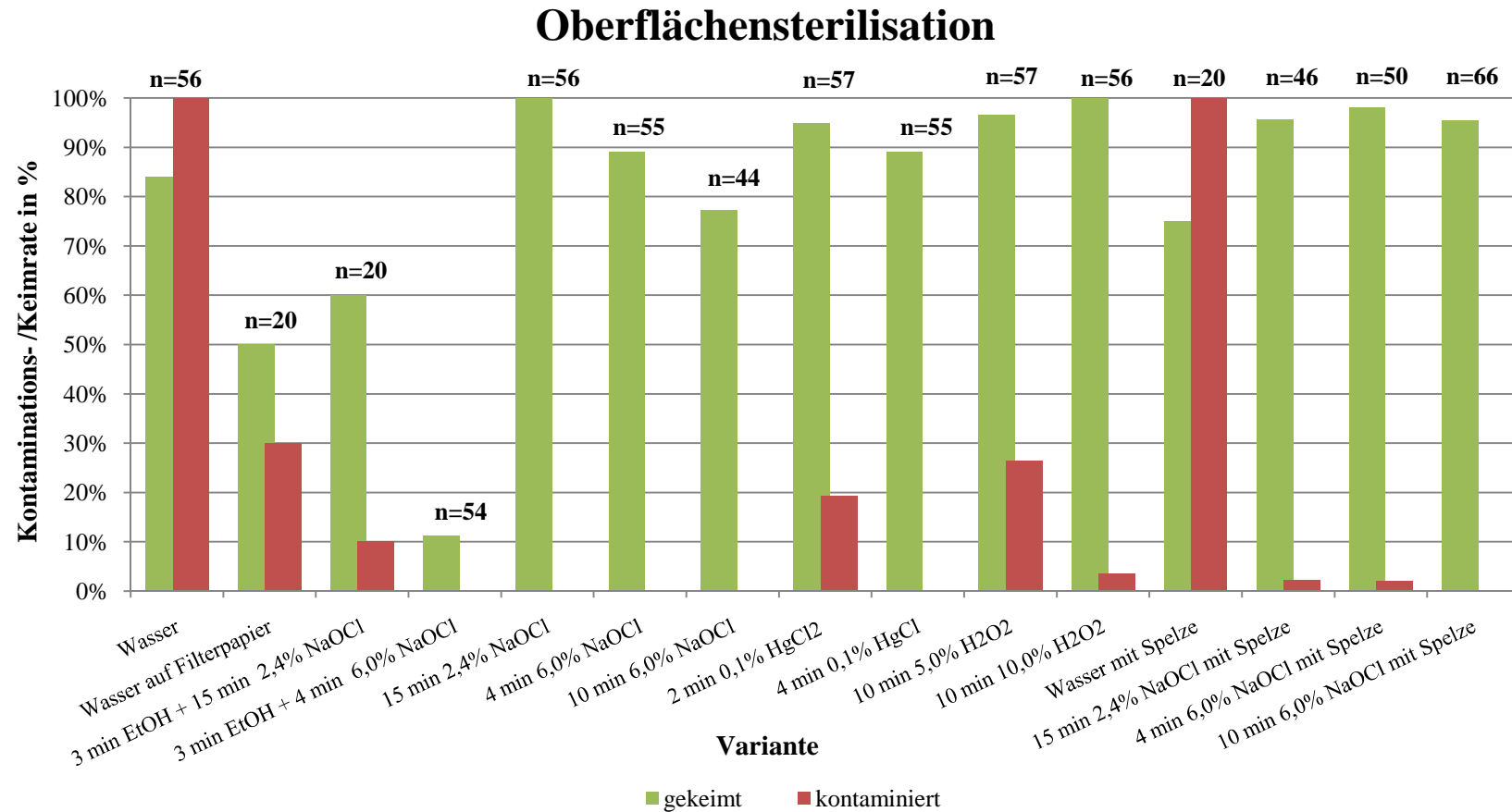
### **3.2 Pflanzengewebekultur**

Für *B.distachyon* wurden bisher nur die Kallusinduktion und die somatische Embryogenese aus unreifen Embryonen (uE) beschrieben (Babla *et al.*, 1995; Draper *et al.*, 2001; Christiansen *et al.*, 2005; Vogel, Leong und Hayden, 2006; Vain *et al.*, 2008; Păcurar *et al.*, 2008; Vogel und Hill, 2007). Die Verwendung von Sprosssegmenten als Ausgangsmaterial für die Kallusinduktion und anschließende Regeneration von Pflänzchen sollten zum einen eine von Gewächshauskulturen unabhängige Methode darstellen und zum anderen die aufwendige Präparation der sehr kleinen Embryonen ersparen.

#### **3.2.1 Oberflächensterilisation und Keimung**

Die Oberflächensterilisation (OS) ist eine wichtige Maßnahme, um den Verlust der Kulturen durch Kontamination mit Mikroorganismen zu verhindern. Angelehnt an die intern verwendete OS-Methode von unreifen Weizenkaryopsen, die für die Isolierung von uE verwendet werden, erfolgte anfänglich die OS der entspelzten, gequollenen Körner von *B.distachyon* mit 3 min Vorbehandlung in 70% Ethanol, danach mit 2,4% NaOCl für 15 min und dreimaligem Spülen im Anschluss. Es konnte im Laufe der Versuche festgestellt werden, dass ein großer Teil des Saatgutes nicht auskeimte und Kontaminationen auftraten. Somit wurde es notwendig, verschiedene Möglichkeiten der OS zu prüfen, um eine geeignete Methode für die weiteren Experimente zu etablieren.

Die Körner wurden wie unter 2.2.2.1 auf Keimmedium (KM) angezogen, um Kontaminationen ggf. besser zu erkennen. Dabei zeigte sich überraschenderweise, dass die Keimrate höher war als auf Filterpapier, welches bei früheren Versuchen verwendet wurde. In Diagramm 3 ist die Keimrate und der prozentuale Befall des Saatgutes mit Mikroorganismen dargestellt.



**Diagramm 3: Prozentuale Rate an ausgekeimten und kontaminierten Körnern bei unterschiedlichen Oberflächensterilisationsmethoden**

14 Tage nach Auslegen reifer Körner auf KM bzw. Filterpapier und Anzucht bei 24°C ohne Licht.



Als Null-Probe mitgeführte Karyopsen, die nur mit autoklaviertem ddH<sub>2</sub>O gespült wurden, zeigten eindeutig die Anwesenheit von Bakterien, z.T. auch Hefen und vor allem Pilzsporen. Diese beeinträchtigten außerdem die Keimfähigkeit des Saatgutes, welches nach der OS teilweise bis zu 100% auskeimen konnte. Die Ausdehnung der Inokulationsdauer bzw. Erhöhung der Konzentration des OS-Mittels führte allgemein zu weniger Kontaminationen, reduzierte allerdings meist auch die Anzahl an auskeimenden Körnern. Eine drastische Reduktion der Keimfähigkeit des Saatgutes konnte zudem durch die 3-minütige Vorbehandlung mit 70% Ethanol beobachtet werden (Abbildung 21), die darüber hinaus keine bessere Oberflächensterilität brachte.



**Abbildung 21: Vergleich der Keimraten nach 4 min OS mit 6% NaOCl.**

***B.distachyon*-Körner nach sieben Tagen Keimung. links: 3 min Vorbehandlung mit 70% Ethanol; rechts: ohne Ethanol-Vorbehandlung.**

Für Körner, die mit Spelze sterilisiert und ausgelegt wurden, konnte eine durchschnittlich um ca. 1-2 Tage verzögerte Keimung beobachtet werden. Dennoch wurde die Keimfähigkeit, vor allem bei längerer OS und höherer NaOCl-Konzentration, weniger beeinträchtigt, als bei den entspelzten Körnern und führte bei der stärksten Behandlung (10 min 6% NaOCl) zu kontaminationsfreien Keimen.

Im Laufe der Anwendung der erfolgreich getesteten OS, zur Bereitstellung des Donormaterials für die Kallusinduktion, kam es weiterhin zu Kontaminationen.

So musste von der 15minütigen Behandlung der entspelzten Körner mit 2,4% NaOCl sowie der 4minütige mit 6% NaOCl Abstand genommen und die Inokulation mit 6% NaOCl auf 10 min erhöht werden.

### 3.2.2 Kallusinduktion und Regeneration

Ziel der Versuche war zunächst, die Reproduktion der Kallusinduktion und Regeneration von Pflanzen aus Sprosssegmenten von *B.distachyon* mit den zuvor entwickelten Kallusinduktionsmedien CIM<sub>B</sub>(11) und CIM<sub>B</sub>(22) (Rezeptur siehe Anhang) und die Ermittlung der durchschnittlichen Ausbeute an embryogenen Kalli (eK), regenerierenden Kalli (rK) und Regeneraten. In weiteren Experimenten sollte versucht werden, die Standardkallusinduktionsmedien zu optimieren, um die Gesamteffizienz des Systems zu erhöhen. Variiert wurden dazu die Medienkonzentrationen von Phytohormonen, Stickstoff- und Kohlenstoffquellen und von Kupfersulfat (Varianten siehe Tabelle 3). Weiterhin wurde getestet, ob die Verwendung dickerer Segmente bzw. die Nutzung von Körnern mit Spelze als Keimmaterial möglich ist, um den Arbeitsaufwand zu verringern. In Abbildung 22 ist der Versuchsablauf mit den Zeitpunkten der Datenaufnahme dargestellt.

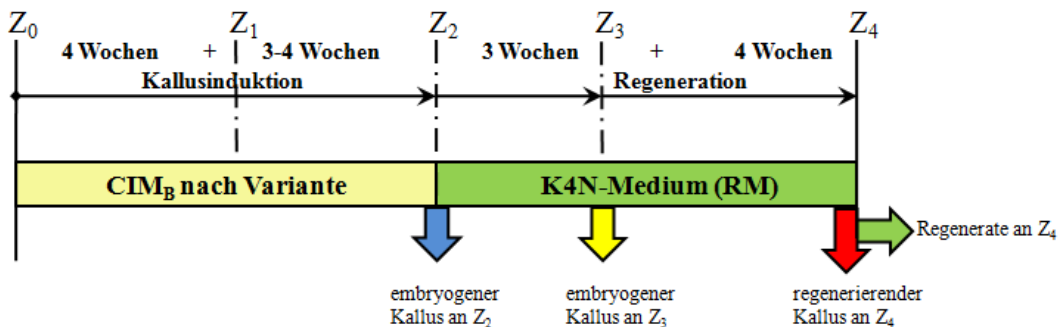


Abbildung 22: Schematischer Versuchsablauf für die Optimierung der Kallusinduktion

Darstellung der Kallusinduktion und Regeneration aus Sprosssegmenten mit Zeitpunkten der Medienwechsel ( $Z_x$ ) und der Datenaufnahme (farbige Pfeile);  $Z_0$ =Kulturstart (präparieren der Segmente),  $Z_1$ =Transfer der Kalli auf frisches CIM<sub>B</sub> nach Variante,  $Z_2$ =Beginn der Regeneration auf RM,  $Z_3$ =Transfer auf frisches RM,  $Z_4$ =Versuchsende (Auswertung der Regeneration), eK an  $Z_3$  enthält die eK aus  $Z_2$ .

Jeder verarbeitete Spross wurde als separate Wiederholung angesehen, aus deren Gesamtheit (n) die Berechnung der mittleren Anzahl an eK bzw. rK pro Spross erfolgte. Der Bezug „pro Spross“ wurde gewählt, da die Anzahl an Segmenten pro Spross variierte, wobei die Menge an eK, bzw. rK in etwa gleich blieb. Dies könnte sonst aufgrund einer Verschiebung des Segment/Kallus-Verhältnisses zu Lasten der längeren Sprosse zu Fehlinterpretationen führen. Der Vergleich von ausschließlich am selben Tag angefertigten Kulturen und deren Wiederholungen war aufgrund des limitierten Ausgangsmaterials und des Verlustes einiger Kulturen durch Kontamination technisch nicht möglich. Aus diesem Grund wurde einheitlich für alle Varianten die Gesamtzahl an verarbeiteten Sprossen, unabhängig vom Versuchstag, zu Grunde gelegt.

Die erhobenen Daten (eK und rK), außer der Anzahl an regenerierten Pflänzchen, wurden einem Signifikanz-Test mit der Software SigmaStat 3.0.1 nach Dunn's Methode ( $P \leq 0,05$ ) unterzogen. Die Berechnung der Standardabweichung des Mittelwertes erfolgte mit Formel 1.

### Formel 1: Standardabweichung des Mittelwertes

$\Delta\bar{x}$ =Standardabweichung des Mittelwertes, n=Probenumfang,  $\bar{x}$ =Mittelwert

$$\Delta\bar{x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n \cdot (n - 1)}}$$

Auf die Angabe der Standardabweichung und Signifikanzprüfung für die Anzahl gebildeter Regenerate wurde verzichtet, da die zugrundeliegenden Werte eine zu hohe Varianz aufweisen.

### 3.2.2.1 Reproduktion der Kallusinduktion und Regeneration

Die Bildung von embryogenem Kallusgewebe, dessen Entwicklung zu somatischen Embryonen und die Regeneration von vollständigen Pflänzchen aus Sprosssegmenten konnte für beide Kallusinduktionsmedien CIM<sub>B</sub>(11) und CIM<sub>B</sub>(22) erfolgreich wiederholt werden (Abbildung 23).

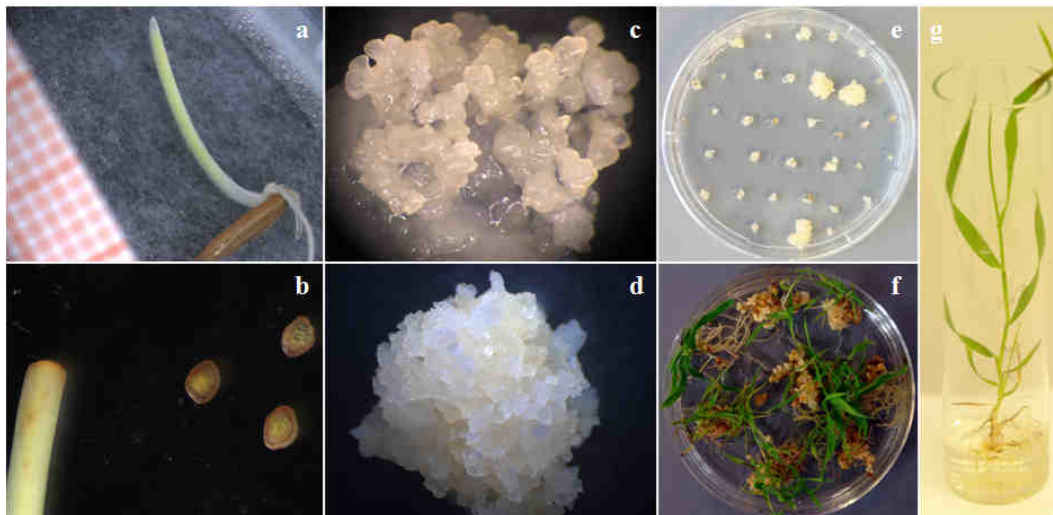


Abbildung 23: Kallusinduktion und Regeneration von *B.distachyon* aus Sprosssegmenten

a= Keimling mit ca. 1,2 cm langem Primärspross, b= 0,3-0,5 mm dünne Sprosssegmente (Ø ca. 1 mm), c= Kallus mit somatischen Embryonen, d= cremig-weißer, krümeliger, embryogener Kallus (Typ II), e= Kalli von Sprosssegmenten auf CIM<sub>B</sub>(11), f= regenerierende Kalli auf RM, g= vollständig regeneriertes Pflänzchen

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Medienvarianten, in Bezug auf Induktion von eK und der Menge an rK festgestellt werden. Die Anzahl an rK-bildenden Segmenten pro Spross schwankte in beiden Fällen zwischen null und vier, wobei ein und zwei rK pro Spross am häufigsten auftraten. In Tabelle 8 ist die Summe der im gesamten Versuchszeitraum verarbeiteten Sprosse und der daraus entstanden eK, rK und Regenerate sowie deren durchschnittliche Anzahl pro Spross bzw. pro rK aufgelistet.

**Tabelle 8: Ausbeute der Kallusinduktion auf CIM<sub>B</sub>(11) und CIM<sub>B</sub>(22)**

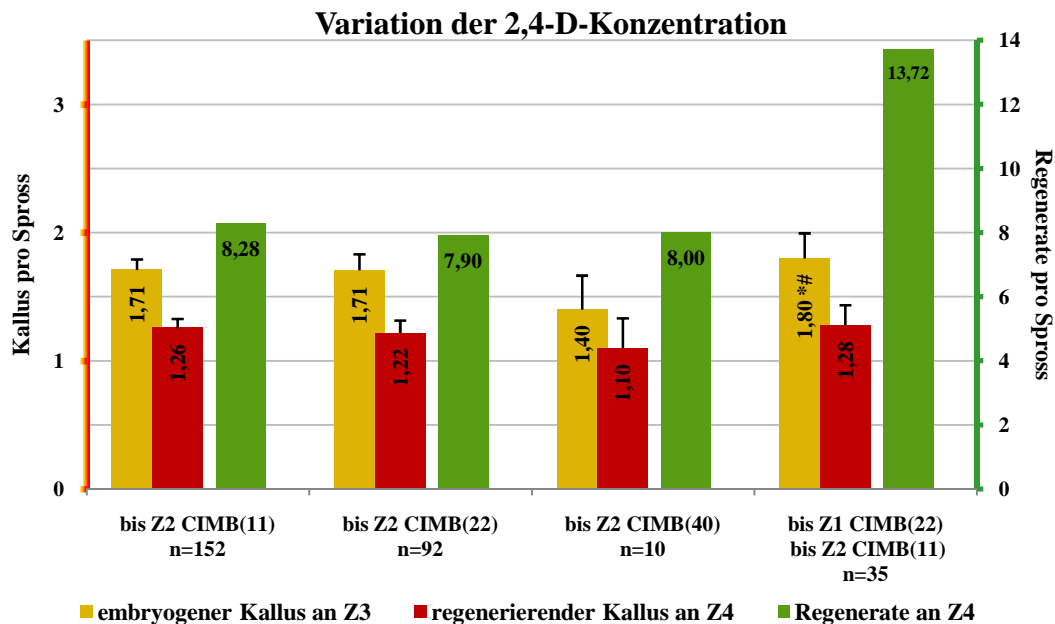
embryogenen Kalli (eK), regenerierenden Kalli (rK) und Regeneraten pro verarbeiteten Spross zu unterschiedlichen Zeitpunkten Z<sub>x</sub> (siehe Abbildung 22), in eK Z<sub>3</sub> sind die eK von Z<sub>2</sub> enthalten.

<i>Medium für KI</i>	<i>CIM<sub>B</sub>(11)</i>		<i>CIM<sub>B</sub>(22)</i>	
<i>verarbeitete Sprosse (n)</i>	<i>152</i>		<i>92</i>	
<i>Sprosse mit eK Z<sub>3</sub> in %</i>	<i>90,13</i>		<i>83,70</i>	
<i>Segmente mit Kallus</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Ø pro Spross±Δx̄</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Ø pro Spross±Δx̄</i>
eK Z <sub>2</sub>	182	1,20±0,08	107	1,16±0,11
eK Z <sub>3</sub>	260	1,71±0,09	157	1,71±0,13
rK Z <sub>4</sub>	191	1,26±0,08	112	1,22±0,10
Regeneration	<i>Anzahl</i>	<i>Ø pro Spross</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Ø pro Spross</i>
Regenerate an Z <sub>4</sub>	1259	8,28	727	7,90

Es ist zu sehen, dass nicht von jedem Spross embryogener Kallus gewonnen werden konnte, dennoch aber im Durchschnitt mit ca. 1,7 Segmenten pro Spross für CIM<sub>B</sub>(11) gerechnet werden kann. Bei beiden Varianten nimmt die Menge an eK nach der Kallusinduktionsphase (Z<sub>0</sub>-Z<sub>2</sub>) auf RM (Z<sub>2</sub>-Z<sub>3</sub>) weiter zu. Jedoch sind nicht alle der eK, die bis zum Zeitpunkt Z<sub>3</sub> entstanden sind, in der Lage im vorgegeben Zeitraum (Z<sub>2</sub>-Z<sub>4</sub>) Regenerate zu bilden. Diese Beobachtung konnte größtenteils auch bei den anderen Medienvarianten der Optimierungsversuche gemacht werden und wird daher später nicht mehr gesondert erwähnt.

### 3.2.2.2 Einfluss der 2,4-D-Konzentration im Kallusinduktionsmedium

In diesem Versuch sollte der Einfluss des Auxinanalogons 2,4-D im CIM<sub>B</sub> auf die Bildung embryogener und regenerierender Kalli und die Anzahl an gebildeten Pflanzen untersucht werden.



**Diagramm 4: Effekt des synthetischen Auxinanalogs 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure**

Dargestellt sind die embryogenen (eK) und regenerierenden Kalli (rK) pro Spross (gelbe und rote Säulen bezogen auf linke y-Achse) und die Anzahl an gebildeten Regeneraten pro Spross (grüne Säulen bezogen auf rechte y-Achse). Die Auswertung erfolgte zu den Zeitpunkten Z<sub>3</sub> und Z<sub>4</sub> (siehe Abbildung 22). Die bei CIM<sub>B</sub> in Klammern angegebene Zahl verweist auf die 2,4-D Konzentration (μM) im Medium. n=Anzahl an Wiederholungen (verarbeitete Sprosse), \*= signifikant verschieden zu CIM<sub>B</sub>(11) (P≤0,05); #= signifikant verschieden zu CIM<sub>B</sub>(22) (P≤0,05)

Diagramm 4 zeigt, dass mit steigender 2,4-D-Konzentration tendenziell die Ausbeute an rK abnimmt. Der Unterschied an rK pro Spross ist zwischen CIM<sub>B</sub>(11) und CIM<sub>B</sub>(22) nur gering. Dieser wird bei CIM<sub>B</sub>(40) zwar deutlicher, wobei jedoch aufgrund des geringen Probenumfang und der hohen Standardabweichung keine Signifikanz nachgewiesen werden kann.

Ein eindeutiger Einfluss des 2,4-D-Gehaltes auf die Gesamteffizienz (Regenerate pro Spross) konnte, bei gleichbleibender Konzentration während der Kallusinduktion, nicht gezeigt werden. Allerdings konnten mit der Variante, bei der nach Z<sub>1</sub> die 2,4-D-Konzentration von 22 μM auf 11 μM gesenkt wurde, signifikant mehr eK im Vergleich zu den Standardvarianten CIM<sub>B</sub>(11) und CIM<sub>B</sub>(22) gewonnen werden und auch die Gesamteffizienz an Regeneraten pro Spross war im Mittel

mit 13,7 deutlich höher. Zudem konnten bei dieser Variante ca. 94,4% der Sprosse bis Z<sub>3</sub> eK bilden. Dies sind etwa 4,3% mehr gegenüber CIM<sub>B</sub>(11) und rund 10,7% mehr im Vergleich zu CIM<sub>B</sub>(22).

### 3.2.2.3 Einfluss der BAP-Konzentration im Kallusinduktionsmedium

Anhand dieses Versuches sollte der Einfluss des Cytokinins 6-Benzylaminopurin (BAP) im CIM<sub>B</sub> ab dem Zeitpunkt Z<sub>1</sub> bis Z<sub>2</sub> auf die Bildung embryogener und regenerierender Kalli und die Anzahl an gebildeten Pflanzen gezeigt werden.

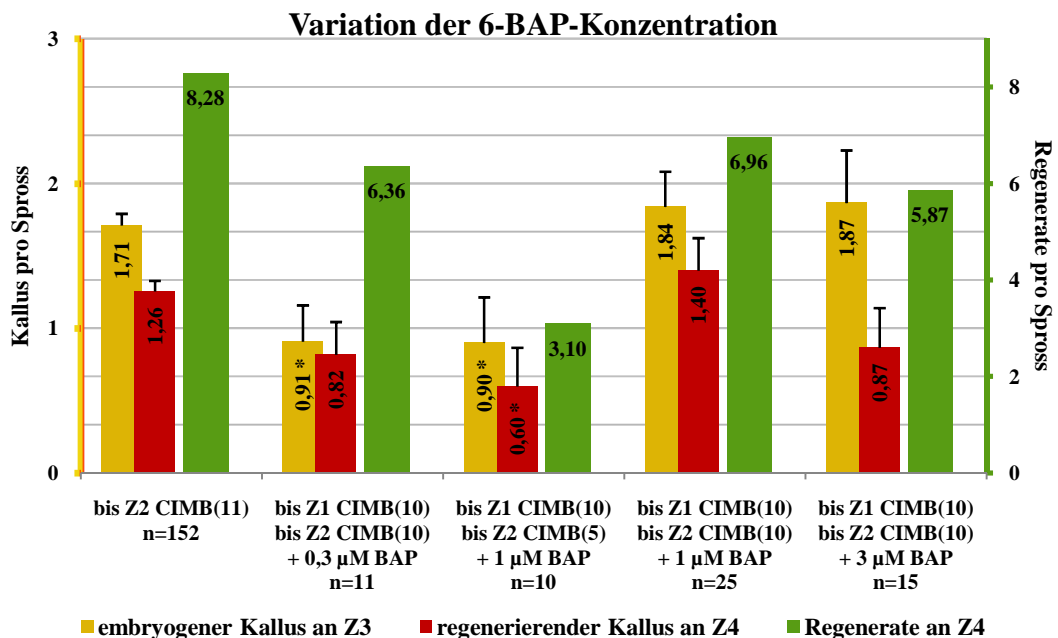


Diagramm 5: Effekt des Cytokinins 6-Benzylaminopurin

Dargestellt sind die embryogenen (eK) und regenerierenden Kalli (eK) pro Spross (gelbe und rote Säulen bezogen auf linke y-Achse) und die Anzahl an gebildeten Regeneraten pro Spross (grüne Säulen bezogen auf rechte y-Achse). Die Auswertung erfolgte zu den Zeitpunkten Z<sub>3</sub> und Z<sub>4</sub> (siehe Abbildung 22). Die bei CIM<sub>B</sub> in Klammern angegebene Zahl verweist auf die 2,4-D Konzentration (µM) im Medium. n=Anzahl an Wiederholungen (verarbeitete Sprosse), \*= signifikant verschieden zu CIM<sub>B</sub>(11) (P≤0,05)

Der Transfer der Kulturen zum Zeitpunkt Z<sub>2</sub> auf CIM<sub>B</sub>-Medium mit BAP führte zu Nekrose an einigen Kalli. Wie Diagramm 5 zeigt wird die geringste Ausbeute an eK und rK pro Spross bei CIM<sub>B</sub>(5) + 1 µM BAP erhalten. Dieser Unterschied

ist gegenüber der Referenz CIM<sub>B</sub>(11) signifikant. Die Addition von BAP führte bei allen Varianten zu weniger Regeneraten pro Spross. Zwar konnte bei Anwesenheit von 1 µM BAP ein höherer Mittelwert der eK bzw. rK, gegenüber des Gesamtmittelwertes aller verarbeiteten Sprosse für CIM<sub>B</sub>(11), festgestellt werden, jedoch wurde im direkten Vergleich des parallel präparierten Standards (CIM<sub>B</sub>(11)) weniger eK und rK erhalten. Diese Beobachtung konnte für zwei an unterschiedlichen Tagen hergestellte Wiederholungen gemacht werden.

### 3.2.2.4 Einfluss zusätzlicher Stickstoffquellen im Kallusinduktionsmedium

Die Bereitstellung zusätzlicher Stickstoffressourcen während der Kallusinduktion erfolgte durch Zugabe von 3 mM Glutamin bzw. 20,61 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> zu CIM<sub>B</sub>(22). Die sich daraus ergebende Auswirkung auf die Embryogenität und Regenerierbarkeit der Kalli ist in Diagramm 6 dargestellt.

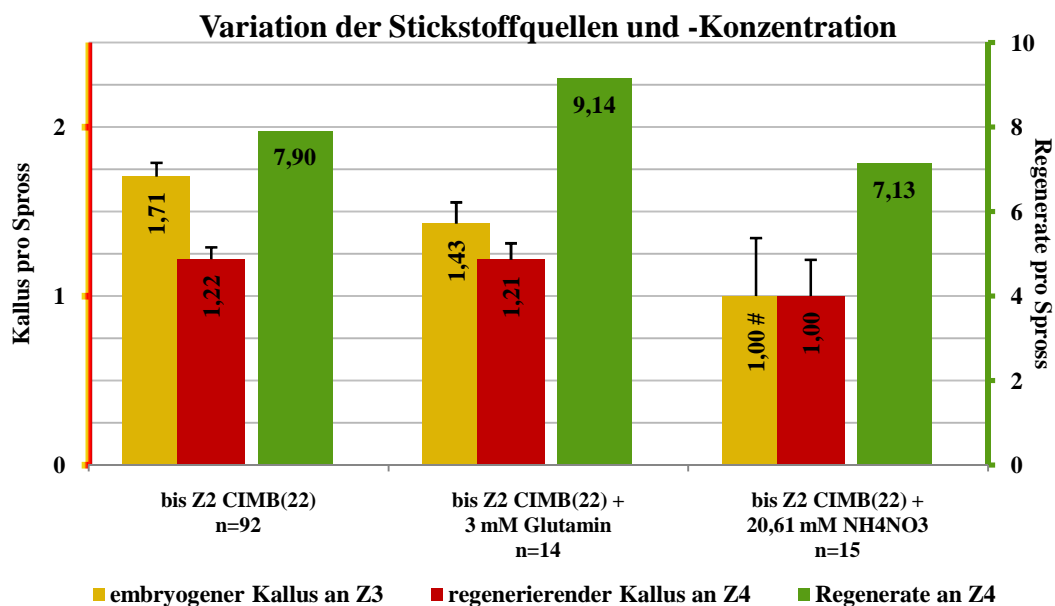


Diagramm 6: Effekt einer zusätzlichen Stickstoffquelle in Form von Glutamin oder NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>

Dargestellt sind die embryogenen (eK) und regenerierenden Kalli (eK) pro Spross (gelbe und rote Säulen bezogen auf linke y-Achse) und die Anzahl an gebildeten Regeneraten pro Spross (grüne Säulen bezogen auf rechte y-Achse). Die Auswertung erfolgte zu den Zeitpunkten Z<sub>3</sub> und Z<sub>4</sub> (siehe Abbildung 22). Die bei CIM<sub>B</sub> in Klammern angegebene Zahl verweist auf die 2,4-D Konzentration (µM) im Medium. n=Anzahl an Wiederholungen (verarbeitete Sprosse); #= signifikant verschieden zu CIM<sub>B</sub>(22) (P≤0,05)



Wie zu erkennen ist, führt die Verwendung von MS-Salzen mit 20,6 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , (entspricht der Originalkonzentration laut Murashige und Skoog, 1962) zu einer signifikant geringeren Ausbeute an eK im Vergleich zum Standard  $\text{CIM}_\text{B}(22)$ . Auch die mittlere Anzahl rK pro Spross ist mit  $1,0 \pm 0,2$  geringer als beim Standard, kann jedoch mit dem verwendeten Probenumfang nicht als signifikant identifiziert werden. Die Zugabe von 3 mM Glutamin führte im Mittel zu ebenso viel rK wie der Standard, besitzt aber eine höhere Gesamteffizienz mit 9,1 Regeneraten pro verarbeiteten Spross.

### 3.2.2.5 Einfluss von $\text{CuSO}_4$ im Kallusinduktionsmedium

Die Zugabe von  $3,75 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  zum Kallusinduktionsmedium, welches zurückgehend auf Murashige und Skoog (1962) nur  $0,10 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  enthält, sollte die Regenerationsfähigkeit der Kalli erhöhen. Dieser Versuch zeigt den Einfluss von Kupfersulfat in  $\text{CIM}_\text{B}(11)$  und  $\text{CIM}_\text{B}(22)$  auf die Induktion embryogener Kalli und deren Regeneration.

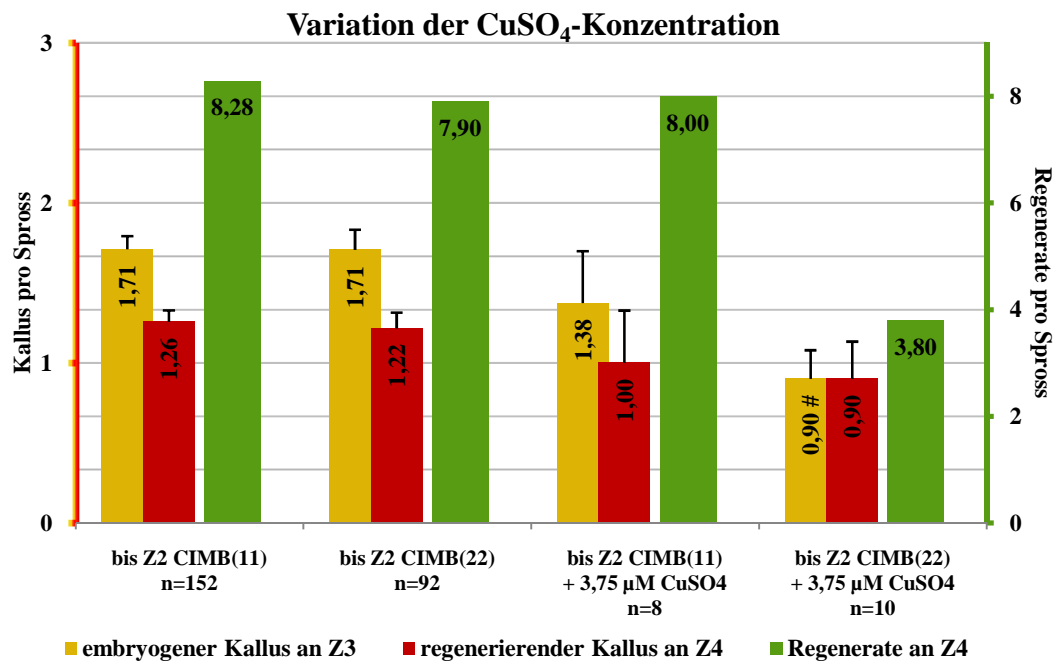


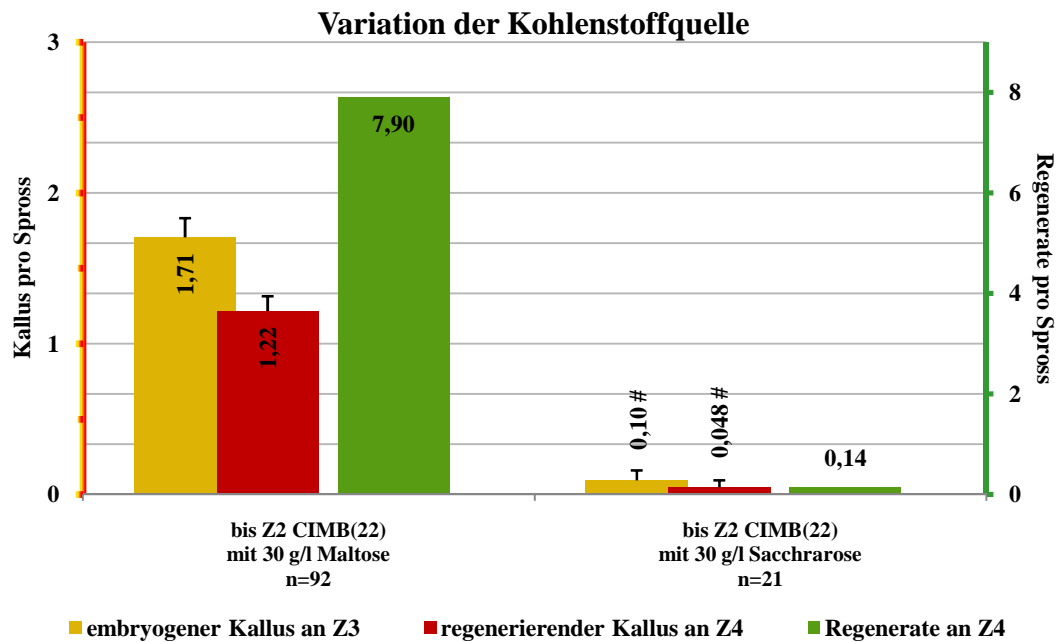
Diagramm 7: Effekt von  $\text{CuSO}_4$

Dargestellt sind die embryogenen (eK) und regenerierenden Kalli (eK) pro Spross (gelbe und rote Säulen bezogen auf linke y-Achse) und die Anzahl an gebildeten Regeneraten pro Spross (grüne Säulen bezogen auf rechte y-Achse). Die Auswertung erfolgte zu den Zeitpunkten  $Z_3$  und  $Z_4$  (siehe Abbildung 22). Die bei  $CIM_B$  in Klammern angegebene Zahl verweist auf die 2,4-D Konzentration ( $\mu M$ ) im Medium. n=Anzahl an Wiederholungen (verarbeitete Sprosse); #= signifikant verschieden zu  $CIM_B(22)$  ( $P \leq 0,05$ )

Die Zugabe von  $3,75 \mu M$   $CuSO_4$  in das Kallusinduktionsmedium reduziert die mittlere Anzahl an eK und rK in Bezug zum adäquaten Medium ohne zusätzliches  $CuSO_4$  (Diagramm 7). Der starke Unterschied zwischen den Varianten  $CIM_B(11)$  und  $CIM_B(22)$  mit zusätzlichem  $CuSO_4$  trat durch die Präparation an zwei verschiedenen Tagen und den geringen Probenumfang auf. Beide Varianten waren aber auch gegenüber dem jeweiligen parallel angefertigten Standard weniger effizient in Bezug auf Kallusbildung (eK) und Regeneration.

### 3.2.2.6 Einfluss der Art der Kohlenstoffquelle im Kallusinduktionsmedium

Eine häufig verwendete Kohlenstoffquelle für Kallusinduktionsmedien ist der Zweifachzucker Saccharose. In den hier bisher verwendeten Kulturmedien  $CIM_B$  waren 30 g/l Maltose enthalten und keine Saccharose. Im Folgenden wurde untersucht, ob der Austausch der Maltose durch die gleiche Menge Saccharose eine Auswirkung auf die Kallusinduktion hat.



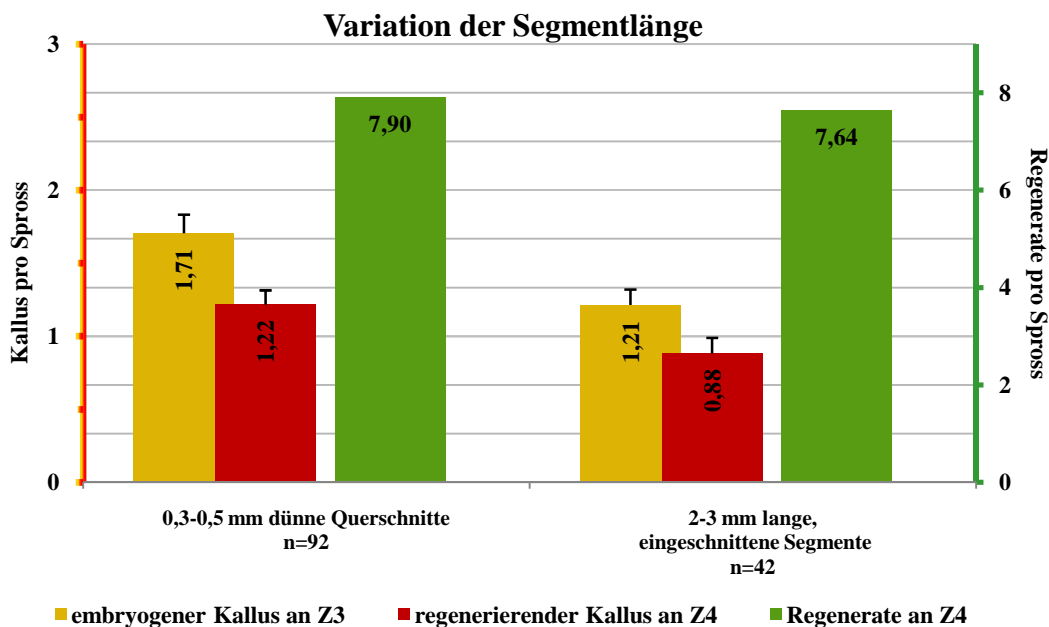
**Diagramm 8: Effekt von Saccharose**

Dargestellt sind die embryogenen (eK) und regenerierenden Kalli (eK) pro Spross (gelbe und rote Säulen bezogen auf linke y-Achse) und die Anzahl an gebildeten Regeneraten pro Spross (grüne Säulen bezogen auf rechte y-Achse). Die Auswertung erfolgte zu den Zeitpunkten Z<sub>3</sub> und Z<sub>4</sub> (siehe Abbildung 22). Die bei CIM<sub>B</sub> in Klammern angegebene Zahl verweist auf die 2,4-D Konzentration (μM) im Medium. n=Anzahl an Wiederholungen (verarbeitete Sprosse); # = signifikant verschieden zu CIM<sub>B</sub>(22) (P≤0,05)

Anhand von Diagramm 8 kann man eindeutig erkennen, dass unter Verwendung von Saccharose als Kohlenstoffquelle so gut wie kein eK und rK gebildet wurde. Der beobachtete Unterschied der Mittelwerte ist signifikant und konnte auch anhand der parallel angefertigten Vergleichsprobe mit Maltose gezeigt werden. Die kultivierten Segmente wurden zum größten Teil unter Anwesenheit von Saccharose nekrotisch oder entwickelten einen zuerst stark proliferierenden, runden Kallus, der sich mit der Zeit stark verdichtete, gelb-orange färbte und später eine glatte Oberfläche besaß und sein Wachstum einstellte. Dieser Kallus war nicht in der Lage, Pflanzen zu regenerieren. Nur vereinzelt konnte die Bildung von cremig-weißen, krümeligen Kallus auf den verdichteten, orangen Kalli beobachtet werden. Insgesamt bildeten nur zwei Kalli von 21 Sprossen einige wenige sE aus, von denen einer drei Pflänzchen regenerierte.

### 3.2.2.7 Einfluss der Explantatgröße

Neben der Optimierung von Medienkomponenten für die Kallusinduktion wurde die Segmentlänge erhöht, um den präparativen Aufwand zu verringern, da beobachtet werden konnte, dass größtenteils nur null bis zwei Segmente pro Spross regenerierenden Kallus bilden. Die im Diagramm 9 als 0,3-0,5 mm dünne Querschnitte bezeichneten Segmente entsprechen dem Standard. Ihre Entwicklung wurde mit der von 2-3 mm langen, ca. alle 0,5 mm eingeschnittenen Segmenten verglichen (Abbildung 13).



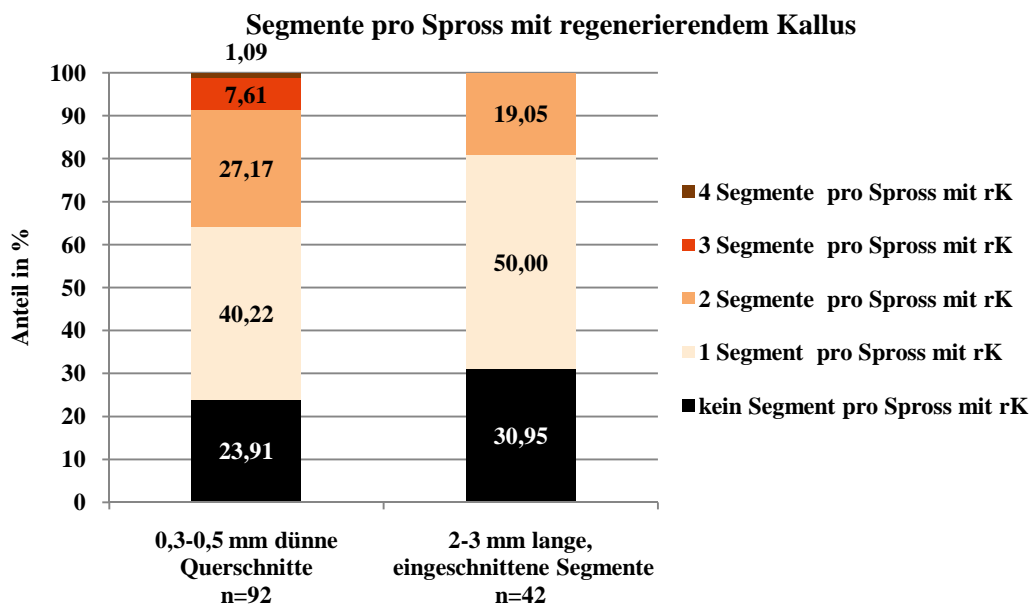
**Diagramm 9: Effekt unterschiedlicher Segmentlängen**

Dargestellt sind die embryogenen (eK) und regenerierenden Kalli (eK) pro Spross (gelbe und rote Säulen bezogen auf linke y-Achse) und die Anzahl an gebildeten Regeneraten pro Spross (grüne Säulen bezogen auf rechte y-Achse). Die Auswertung erfolgte zu den Zeitpunkten Z<sub>3</sub> und Z<sub>4</sub> (siehe Abbildung 22). Die bei CIM<sub>B</sub> in Klammern angegebene Zahl verweist auf die 2,4-D Konzentration (µM) im Medium. n=Anzahl an Wiederholungen (verarbeitete Sprosse); #= signifikant verschieden zu 0,3-0,5 mm dünne Querschnitte (P≤0,05)

Durch die 2-3 mm langen Explantate entstanden weniger Segmente pro Spross, die kultiviert werden mussten, und die Präparation gelang etwas schneller. Der Kallus konnte aus den Schnittfurchen herauswachsen und war insgesamt größer

als bei der Standardvariante (0,3-0,5 mm dünne Querschnitte). Aus Diagramm 9 geht hervor, dass die mittlere Anzahl eK und rK pro Spross bei den längeren, eingeschnittenen Segmenten gegenüber dem Standard geringer war. Eine Signifikanz des Unterschiedes konnte allerdings mit dem vorhandenen Probenumfang nicht nachgewiesen werden. Mit längeren Segmenten konnten außerdem 88,10% der verarbeiteten Sprosse bis Z<sub>3</sub> eK bilden, wohingegen es bei den kürzeren nur 80,73% waren. Allerdings waren am Ende nur insgesamt 69,05% der Sprosse mit größeren Explantaten in der Lage bis Z<sub>4</sub> Pflanzen zu regenerieren, bei dem Standard jedoch 76,09%.

Es konnte bei den langen Segmenten gezeigt werden, dass zu 50% nur ein Segment pro Spross in der Lage war rK zu bilden und zwei Segmente pro Spross das Maximum waren, wohingegen bei den dünneren Schnitten in seltenen Fällen (1,09%) bis zu vier Segmente pro Spross aus eK Pflänzchen regenerierten (Diagramm 10). Trotz zudem durchschnittlich weniger rK pro Spross konnten im Mittel etwa gleich viele Regenerate pro Spross gewonnen werden.



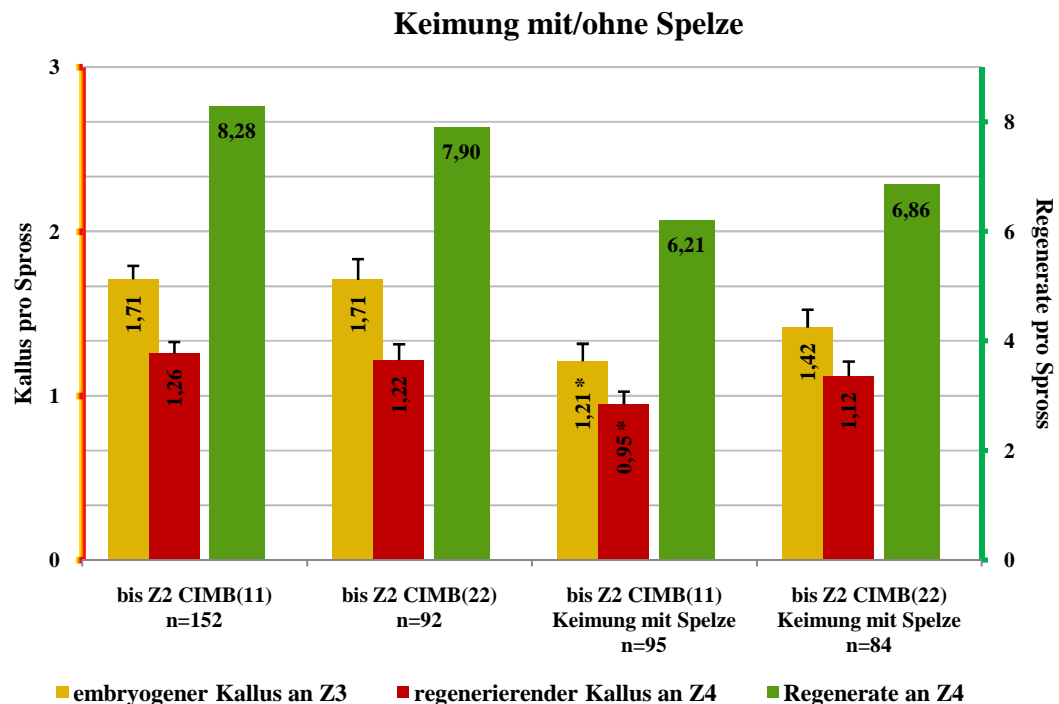
**Diagramm 10:** prozentuale Verteilung der Anzahl an Segmenten pro Spross die rK gebildet haben.

Die Auswertung der rK erfolgte zum Zeitpunkt Z<sub>4</sub> (Abbildung 22). Die prozentuale Verteilung ergibt sich aus allen Wiederholungen. n=Anzahl an Wiederholungen (verarbeitete Sprosse). Die bei CIM<sub>B</sub> in Klammern angegebene Zahl verweist auf die 2,4-D Konzentration (µM) im Medium

### 3.2.2.8 Einfluss der Keimung mit Spelze auf die Kallusinduktion

Die Körner von *B.distachyon* liegen zwischen einer Hüll- und einer Deckspelze. Diese schützen die inneren Blütenorgane und das Korn vor schädlichen Umwelteinflüssen und wurden bisher vor dem Oberflächensterilisieren mühevoll per Hand entfernt. Da diese Arbeit sehr viel Zeit in Anspruch nimmt und die Gefahr besteht, dass man den kleinen Embryo dabei beschädigt, wurde versucht darauf zu verzichten und die Karyopsen mit Spelzen oberflächensteril zu bekommen und auf KM auskeimen zu lassen. Die Sprosse wurden dazu erst unmittelbar vor der Präparation von Korn und Spelze gelöst und wie üblich weiter behandelt (2.2.2.1).

Das größte Problem bei der Verwendung von nicht entspelzten Körnern, war das häufige Auftreten von Kontaminationen. Dies konnte in späteren Versuchen durch Ausdehnung der Oberflächensterilisationsdauer minimiert werden. Auffällig bei der Präparation waren zudem teilweise braune Stellen an den auskeimenden Sprossen. Bei den daraus geschnittenen Segmenten entstanden auf dem CIM<sub>B</sub>-Medium nekrotische Bereiche, die in den meisten Fällen zum vollständigen Absterben der Explantate führten.



**Diagramm 11: Effekt der Keimung mit Spelze**

Dargestellt sind die embryogenen (eK) und regenerierenden Kalli (eK) pro Spross (gelbe und rote Säulen bezogen auf linke y-Achse) und die Anzahl an gebildeten Regeneraten pro Spross (grüne Säulen bezogen auf rechte y-Achse). Die Auswertung erfolgte zu den Zeitpunkten Z<sub>3</sub> und Z<sub>4</sub> (siehe Abbildung 22). Die bei CIM<sub>B</sub> in Klammern angegebene Zahl verweist auf die 2,4-D Konzentration (µM) im Medium. n=Anzahl an Wiederholungen (verarbeitete Sprosse); \*= signifikant verschieden zu CIM<sub>B</sub>(11) (P≤0,05); #= signifikant verschieden zu CIM<sub>B</sub>(22) (P≤0,05)

Diagramm 11 zeigt, dass bei beiden Varianten CIM<sub>B</sub> mit 11,1 µM und 22,2 µM 2,4-D aus den Sprosssegmenten von ausgekeimten Karyopsen mit Spelze weniger eK und rK gewonnen werden konnten, als auf vergleichbarem Medium mit entspelzten Körnern. Dieser Unterschied „mit oder ohne Spelze“ ist für CIM<sub>B</sub>(11) signifikant. Die mittlere Anzahl an regenerierten Pflänzchen pro rK ist mit 6,13-6,56 für alle Varianten in etwa gleich. Jedoch konnte durch die geringere Anzahl an rK bei den Versuchen mit Spelze eine schlechtere Gesamteffizienz an Regeneraten pro Spross erzielt werden.

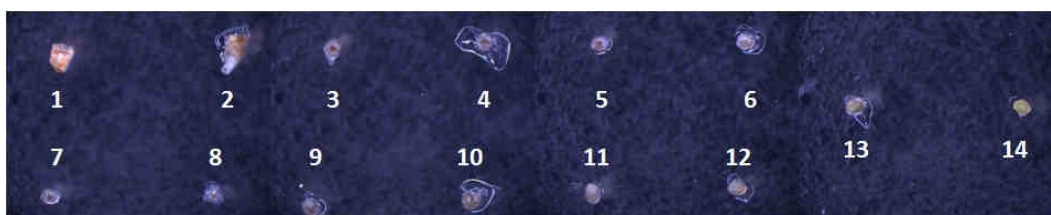
### 3.2.3 Identifizierung des embryogenen Kallus-bildenden Sprossbereiches

In den Vor- und Optimierungsversuchen wurde beobachtet, dass nicht alle Bereiche des Sprosses in der Lage sind embryogenen Kallus (eK) zu bilden. Demnach galt es herauszufinden, an welcher Stelle sich die regenerationsfähigen Kalli bilden und auf welches Gewebe diese Reaktion zurückzuführen ist. Durch Kombination von Kultivierung und visueller Analyse wurde in verschiedenen Ansätzen versucht, diesen Ort zu identifizieren, um Schlussfolgerungen für effektiveres Präparieren zu ziehen.

#### 3.2.3.1 Visuelle Dokumentation der Kallusentwicklung unterschiedlicher Segmente

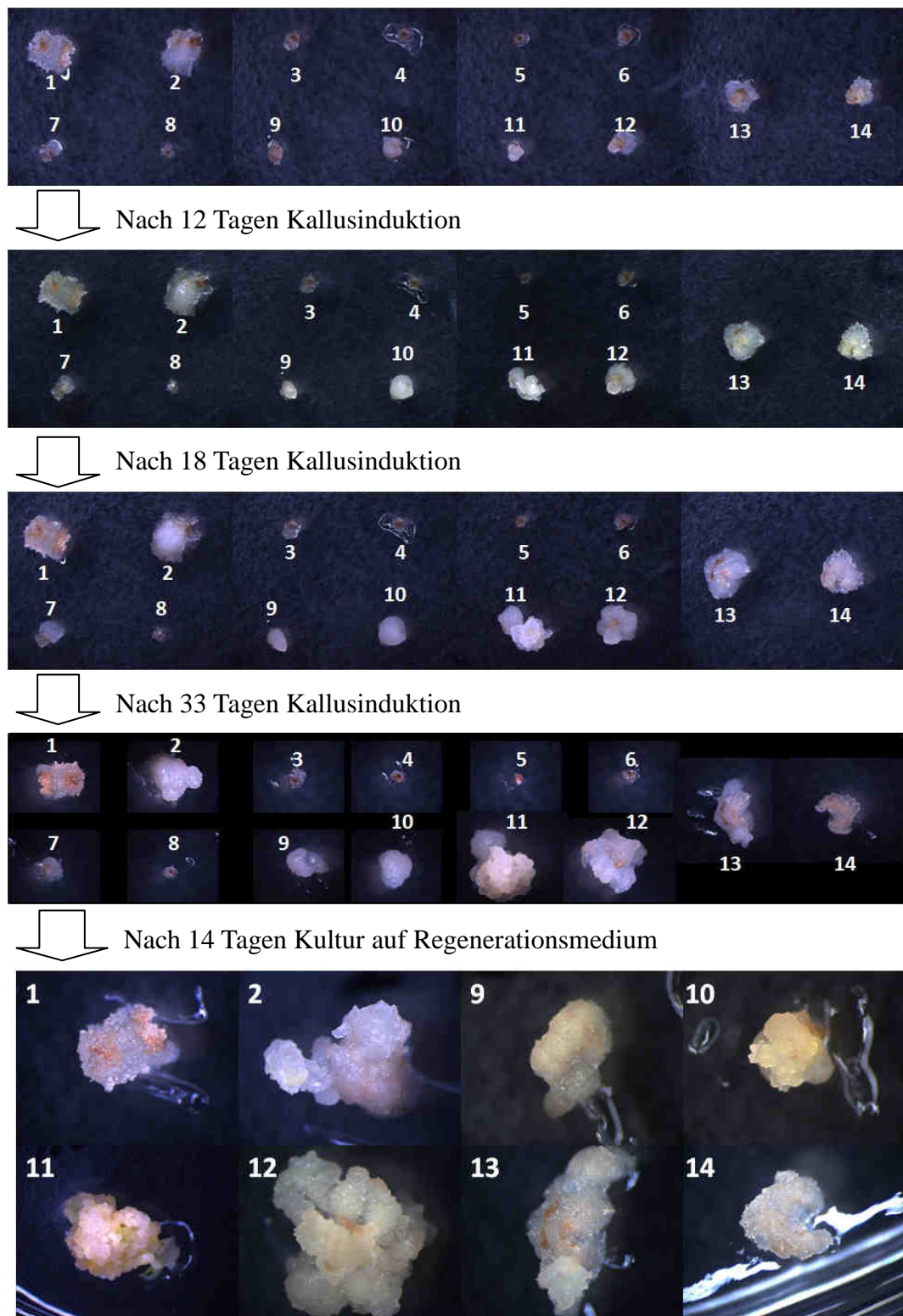
Die visuelle Dokumentation der Kallusentwicklung mit dem Binokular erfolgte im Verlauf von 33 Tagen Kallusinduktion zu fünf Zeitpunkten und abschließend nach 14 Tagen Regeneration (2.2.2.4.1). Dies wurde einmal für 0,3-0,5 mm dünne Querschnitte eines Sprosses, zweimal für lange, eingeschnittene Segmente eines Sprosses und zwei ganze, eingeschnittene Sprosse dokumentiert und im Folgenden dargestellt. Der obere Bereich der Sprosse (ca. 1/3), der ausschließlich aus dem ersten Blatt und der Koleoptile bestand, wurde vor der Präparation abgetrennt und verworfen, da er erfahrungsgemäß nicht zur Bildung regenerierbarer Kalli beiträgt.

#### 0,3-0,5 mm dünne Segmente



Nach 7 Tagen Kallusinduktion





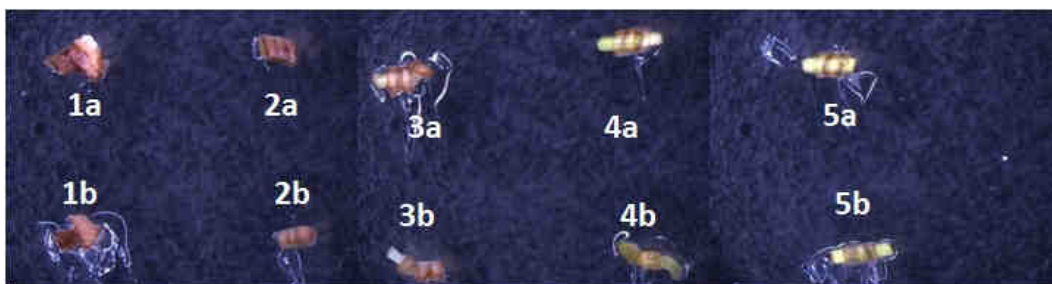
**Abbildung 24: Kallusentwicklung und Regeneration der ca. 0,3 – 0,5 mm dünnen Segmente von einem Spross (1mal)**

**Segmente nach 33 Tagen Kallusinduktion und 2 Wochen Kultur auf Regenerationsmedium. Die Zerteilung und Nummerierung erfolgte akropetal am Embryo. Segmente ohne Kallusentwicklung wurden nicht auf RM transferiert. Vergrößerung bei Regeneration 2-fach, außer Segment 11 0,8-fach**

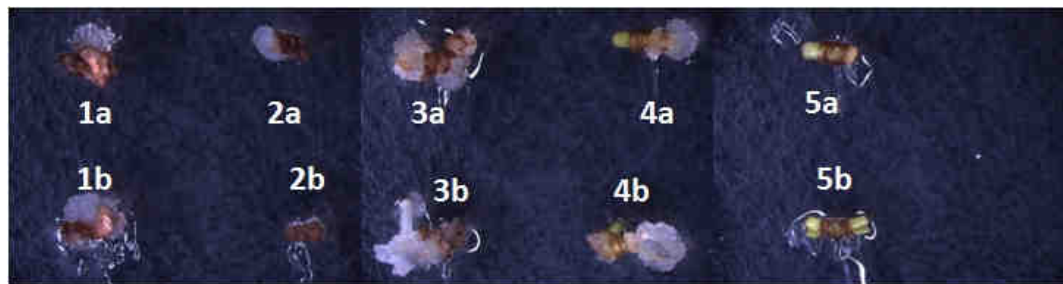
In Abbildung 24 sind die unterschiedlichen Kallustypen zu erkennen, die sich aus den verschiedenen Segmenten des Sprosses entwickeln. Segment 1 und 2 stammen von dem im Korn zurückgebliebenen Skutellum. Die Segmente 3-12 wurden in akropetaler Reihenfolge präpariert, bis in den Segmenten 13 und 14 nur noch die eingerollten ersten Blätter zu erkennen waren. Segment 1, 7, 13 und 14 bildeten durchsichtigen, schwammigen Kallus aus. Segment 2, 9 und 10 zeigten hingegen einen kompakten, festen Kallus, der eine eher glatte Oberfläche besitzt. Keiner dieser Kallustypen wurde embryogen. Das Segment 11 bildete den gewünschten Kallus Typ II, der cremig weiß und krümelig ist (Draper *et al.*, 2001). Die Aufnahme nach 33 Tagen lässt an diesem Kallus embryogene Strukturen erkennen, aus denen nach 14 Tagen erste Sprosse aus den somatischen Embryonen regenerierten (sE), wie in Abbildung 24 (unten) zu sehen ist. Die Segmente 3-6 und 8 wurden unmittelbar nach dem Transfer auf Kallusinduktionsmedium nekrotisch und zeigten keine Kallusbildung.

Die genaue Zusammensetzung der Segmente aus den verschiedenen Geweben ließ sich auf Grund der Reflektionen an den Schnittflächen nicht erkennen. Somit kann nicht gesagt werden, aus welchem Gewebetyp der embryogene, regenerierende Kallus Typ II hervorgegangen ist.

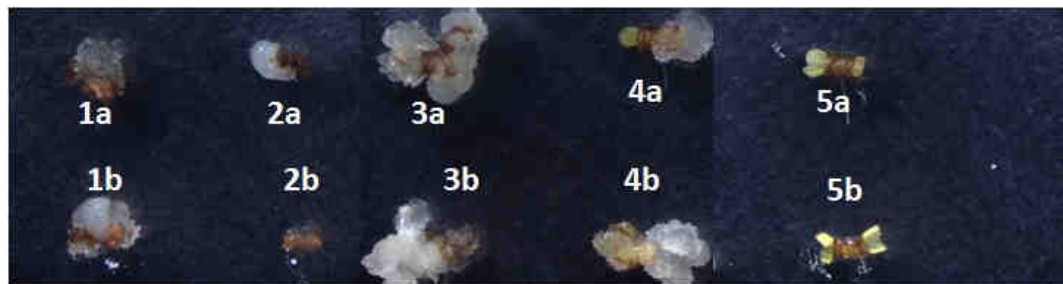
### 2-3 mm lange, eingeschnittene Segmente



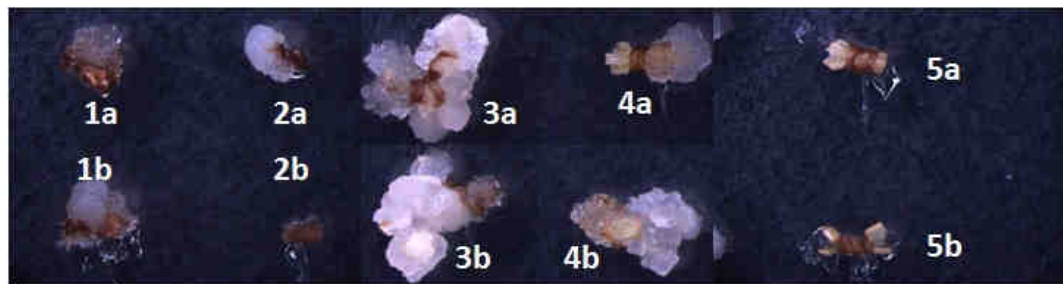
Nach 7 Tagen Kallusinduktion



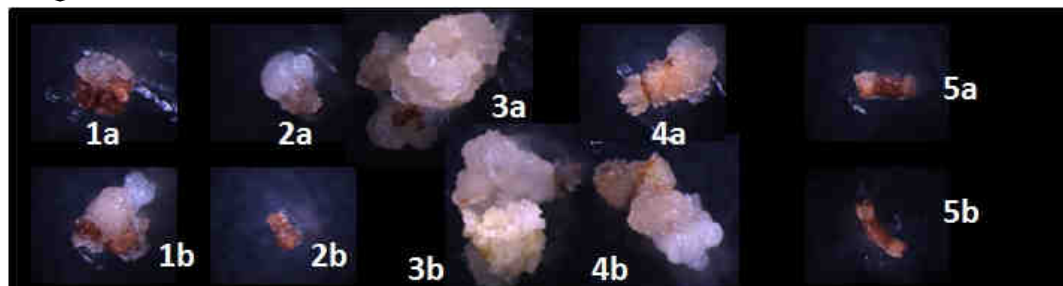
↓ Nach 12 Tagen Kallusinduktion



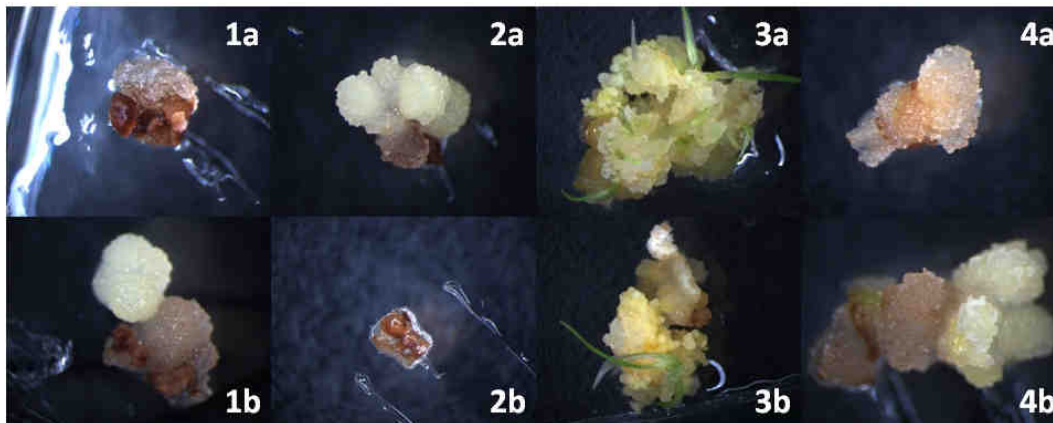
↓ Nach 18 Tagen Kallusinduktion



↓ Nach 33 Tagen Kallusinduktion



↓ Nach 14 Tagen Kultur auf Regenerationsmedium

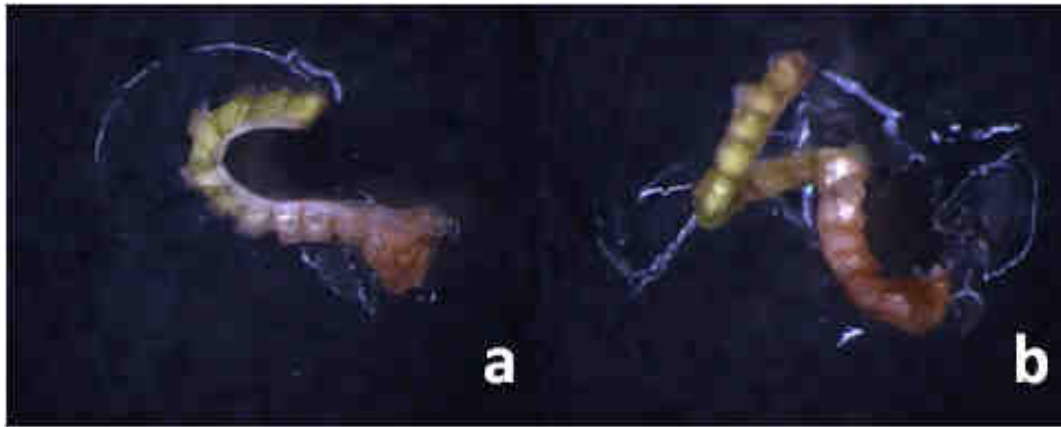


**Abbildung 25: Kallusentwicklung und Regeneration der ca. 2 – 3 mm langen, eingeschnittenen Segmente von einem Spross (2mal)**

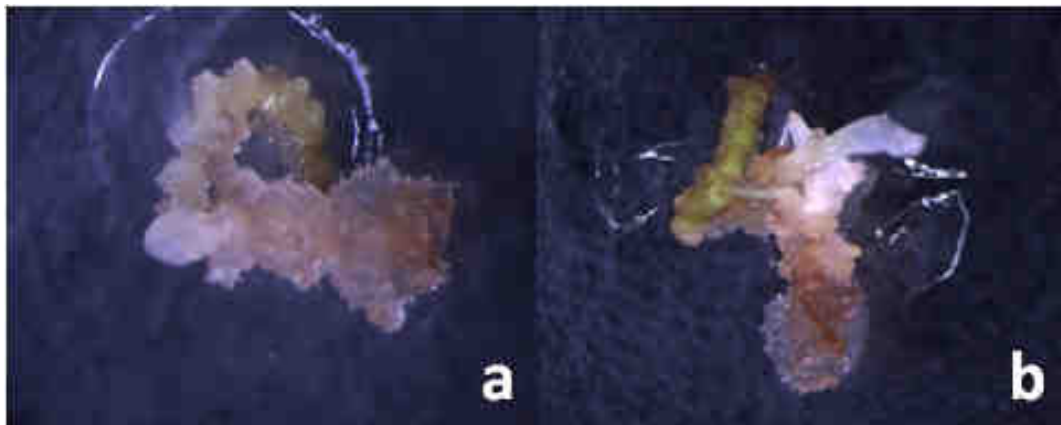
**Spross a und b nach 33 Tagen Kallusinduktion und 2 Wochen Kultur auf Regenerationsmedium. Die Nummerierung erfolgte aufsteigend von der Sprossbasis. Vergrößerung 1,5fach, außer Segment Nummer 3a und 3b 0,8fache**

Auch bei den größeren Segmenten, die mehrmals eingeschnitten wurden, konnten die unterschiedlichen Kallustypen beobachtet werden (Abbildung 25). Die Explantate 3-5 beider Sprosse verhalten sich bei der Kallusentwicklung ähnlich. Anfänglich konnte die Streckung des inneren Spross-Bereiches beobachtet werden, danach begann nach ein paar Tagen hauptsächlich an den Schnittenden eine ungeordnete Teilung einiger Zellen. Die äußere Hülle, die Koleoptile, verbräunte bereits nach kurzer Zeit und schnürte den Kallus wie ein Ring in der Mitte ein. Die Explantate 5a und 5b bestanden im Inneren nur aus älterem Blattgewebe und bildeten den weichen, durchsichtigen Kallus. Segment 1b und 2a entwickelten zum Teil ebenfalls weichen Kallus und zum anderen runde Strukturen mit der glatten Oberfläche. Von den jeweils fünf Explantaten bildete nur das dritte somatische Embryonen aus dem Kallus und regenerierte in den folgenden 14 Tagen auf RM kleine Pflänzchen. In Abbildung 25 ist ebenfalls zu sehen, dass die anderen Kallustypen keine embryogenen Strukturen entwickelten. Der Kallus war nach gleicher Kulturdauer größer als bei den dünnen Segmenten und begann früher erste Pflänzchen zu regenerieren.

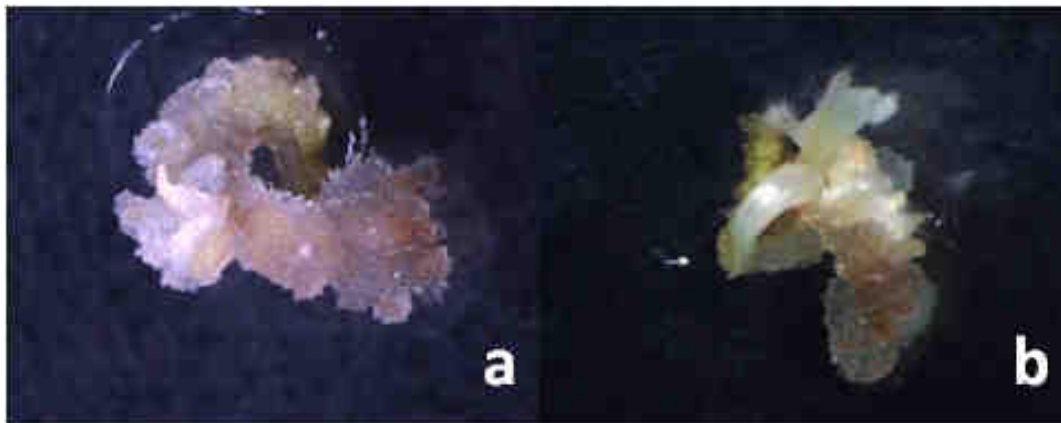
ganze, eingeschnittene Sprosse



⏏ Nach 7 Tagen Kallusinduktion

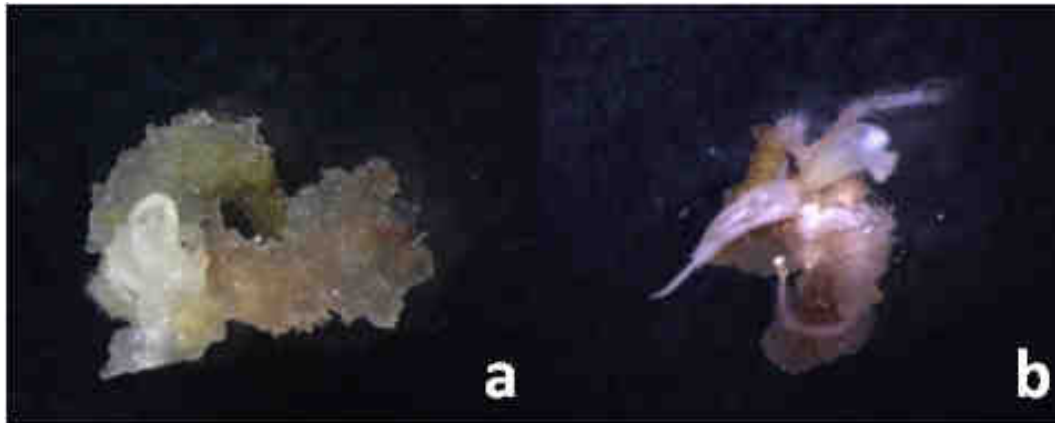


⏏ Nach 12 Tagen Kallusinduktion

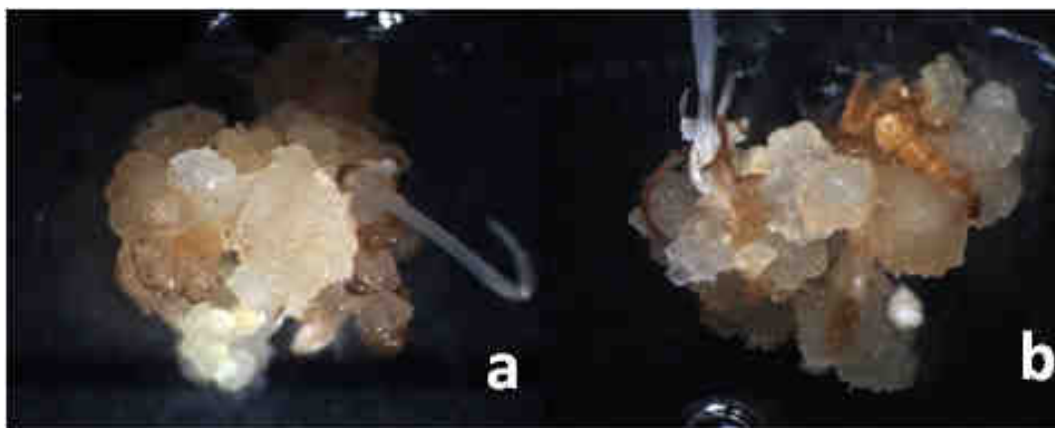


⏏ Nach 18 Tagen Kallusinduktion

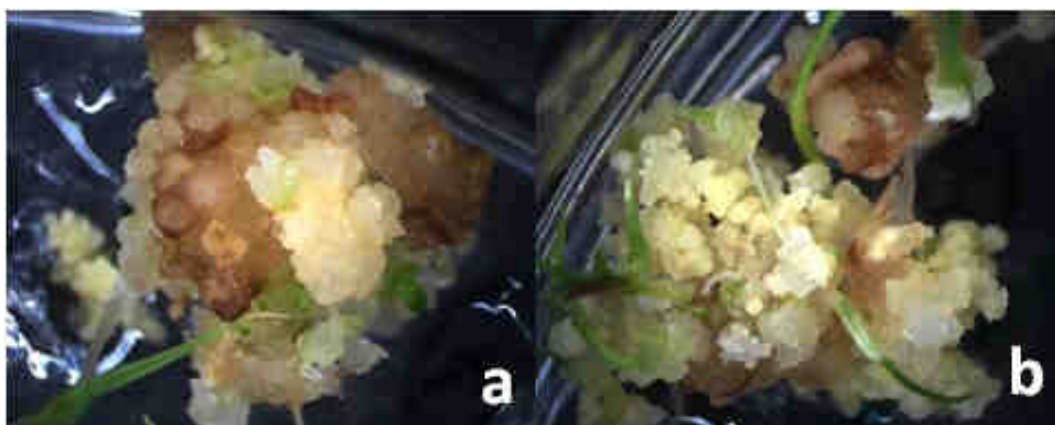




⇩ Nach 33 Tagen Kallusinduktion



⇩ Nach 14 Tagen Kultur auf Regenerationsmedium



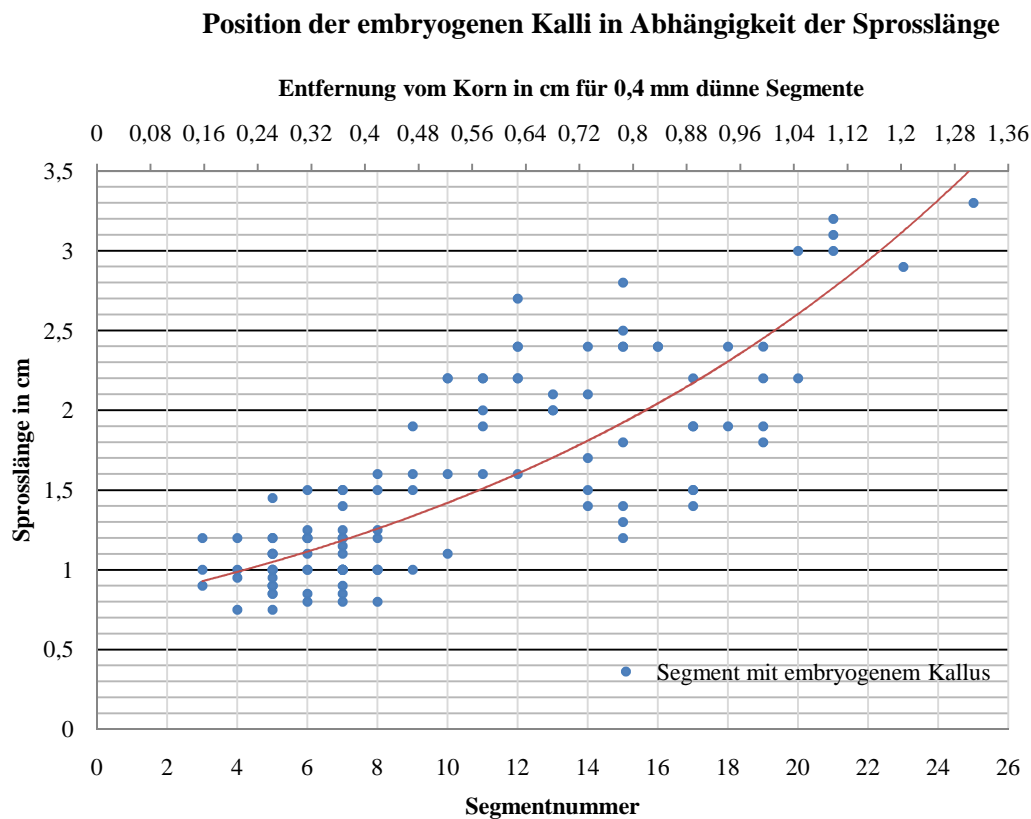
**Abbildung 26: Kallusentwicklung und Regeneration ganzer, eingeschnittener Sprosse (Spitze entfernt)**

**Spross a und b nach 33 Tagen Kallusinduktion und 2 Wochen Regeneration. Beide Aufnahmen wurden mit 0,8-facher Vergrößerung gemacht.**

Wurde der gesamte untere Bereich des Sprosses mit einem Teil der ersten Blätter verwendet und ca. alle 0,5 mm eingeschnitten, bildete sich an den Schnittstellen Kallus, der aus den verschiedenen bereits oben beschriebenen Typen zusammengesetzt war (Abbildung 26). Die Koeoptile verbräunte leicht und entwickelte nach ein paar Tagen durchsichtigen, weichen Kallus. Nach sieben bzw. 12 Tagen Kallusinduktion hatten sich junge, chlorophyllfreie Blätter in der Mitte der Sprossexplantate (ohne Spitze des Sprosses) gebildet. Neben diesen konnten regenerierte Wurzelhärchen und Wurzelspitzen sowie Ansätze von sE identifiziert werden. Nach 33 Tagen auf Kallusinduktionsmedium waren die neuen Blätter und Wurzeln teilweise degeneriert und wurden von kleinen, wenig differenzierten sE umgeben. In den 14 folgenden Tagen auf RM proliferierte der embryogene Kallus weiter und bildete eine Vielzahl reifer somatischer Embryonen, aus denen neue Pflänzchen regenerierten (Abbildung 26 unten).

### **3.2.3.2 Abhängigkeit der Kallusinduktion von der Sprosslänge**

Beim Auskeimen des Saatgutes entwickeln sich nicht alle Sprosse gleich schnell und bilden somit einen Pool mit unterschiedlichen Längen. Um zukünftig nicht zu viel Material verwerfen zu müssen und ein Vielfaches von dem auszulegen, was am Ende mit der gewünschten Sprosslänge von 0,8–2 cm verarbeitet werden kann, wurde untersucht, wie sich die Sprosslänge (gesamter Spross bis zur Spitze der Koeoptile) auf die Bildung von embryogenem Kallus (eK) aus den 0,3–0,5 mm dünnen Segmenten auswirkt. Es galt festzustellen, ob längere Sprosse ebenfalls in der Lage sind, embryogenen Kallus zu bilden und in welcher Position sich der dafür kompetente Bereich befindet, um zukünftig gegebenenfalls nur diesen Bereich zu verwenden.



**Diagramm 12: Position der embryogenen Kallus bildenden Segmente in Abhängigkeit der Länge des jeweils verarbeiteten Sprosses**

Aufgetragen sind die 0,3 – 0,5 mm dünnen Segmente von 0,75 bis 3,3 cm langen Sprossen die nach fünf Wochen Kallusinduktion embryogenen Kallus gebildet haben. Die Anzahl an geschnittenen Sprossen variierte entsprechend der Verfügbarkeit von 1-9 pro getesteter Sprosslänge und betrug insgesamt 110. Die Entfernung der Segmentpositionen vom Korn wurde für 0,4 mm dünne Segmente berechnet.

Wie man in Diagramm 12 sehen kann, sind die untersuchten Sprosse von 0,75 bis 3,3 cm Länge in der Lage eK zu bilden. Gezeigt werden konnte zudem, dass sich die Position der Segmente, die zur Bildung von eK befähigt sind, mit zunehmender Sprosslänge vom Korn weg verschiebt. Jedoch liegt dieser Bereich zumeist in der unteren Hälfte des Sprosses und nie im oberen Drittel, welches nur aus den ersten Blättern und der Koleoptile besteht.



### 3.2.3.3 Mikroskopische Untersuchungen

Die mikroskopische Untersuchung eines jungen *B.distachyon*-Sprosses sollte Auskunft über dessen Aufbau, die Lage der Gewebe und teilungsaktiven Bereiche geben, um die in den Abschnitten 3.2.3.1 und 3.2.3.2 gemachten Beobachtungen interpretieren zu können.

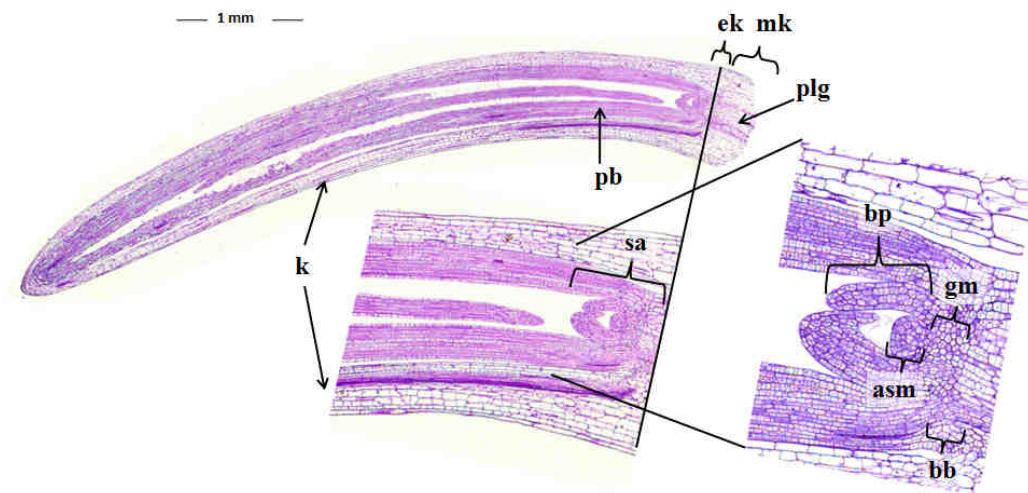
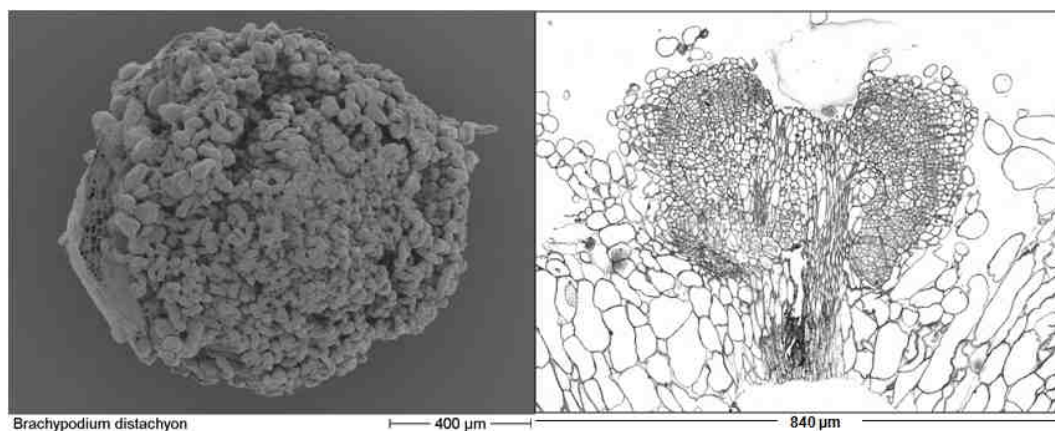


Abbildung 27: Sprosslängsschnitt von *B.distachyon*

Der Spross wurde unmittelbar am Korn vom Embryo abgetrennt, längs 1 mm dünn geschnitten und mit Kristallviolett gefärbt; mk= Mesokotyl, plg= primäres Leitgewebe, ek= Epikotyl, pb= Primärblatt, k= Koleoptile, sa= Sprossapex, bp= Blattprimordium; asp= apikales Sprossmeristem, gm= Grundmeristem, bb= Blattbasis

In Abbildung 27 ist der Längsschnitt eines ca. drei Tage alten Sprosses zu sehen. Auf der rechten Seite befindet sich das Mesokotyl (mk) mit dem Primärleitgewebe (lg), welches von der Koleoptile (k) und dem Skutellum (nicht dargestellt) begrenzt wird. Die Koleoptile umhüllt die ersten Blätter und besteht aus chlorophyllfreien, langgestreckten, differenzierten Zellen. Das apikale Sprossmeristem, das Grundmeristem, die Blattprimordien und die Blattbasen bestehen aus kleinen, runden, dicht gepackten, wenig differenzierten und teilungsaktiven Zellen (Wagenitz, 2003; Nabors, 2007; Beck, 2010).

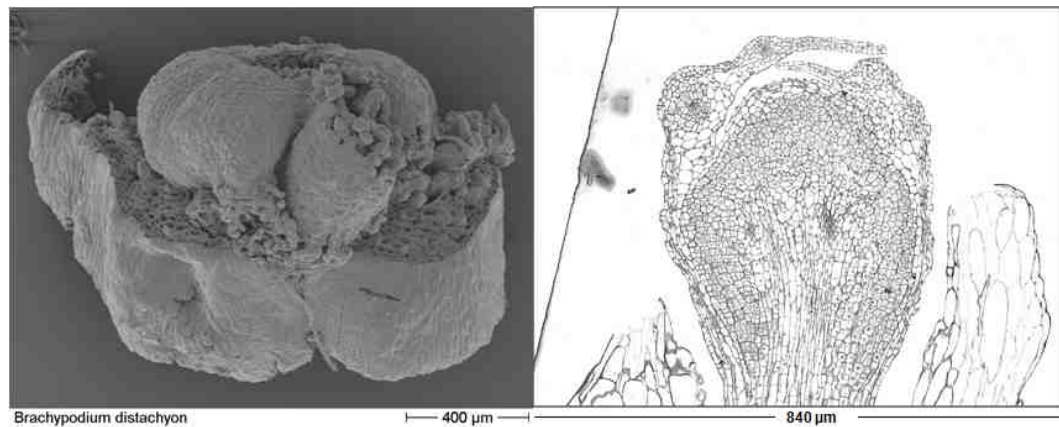
Um die Gewebestruktur der kultivierten Segmente und deren Reaktion auf Kallusinduktionsmedium zu bestimmen, wurden einige Querschnitte von unterschiedlichen Positionen nach sieben Tagen auf CIM<sub>B</sub>(11) mit dem Rasterelektronenmikroskop betrachtet und von anderen senkrecht der Schnittachse Dünnschnitte angefertigt. Der frühe Zeitpunkt wurde gewählt, um möglichst noch die ursprünglichen Gewebe erkennen zu können. Morphologische Veränderungen während der Kultivierung der Segmente ließen jedoch eine genaue Bestimmung des zellulären Ursprunges der Kallusbildung nicht zu.



**Abbildung 28: Segmente mit Kallusentwicklung nach sieben Tagen Kallusinduktion**

**links: Aufnahme mit dem Rasterelektronenmikroskop, rechts: vertikaler Schnitt eines Querschnittes (10x)**

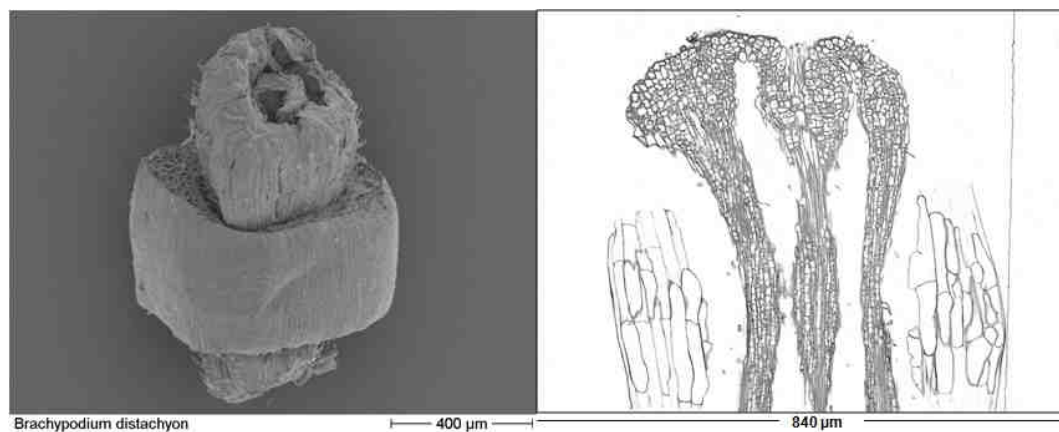
In Abbildung 28 sind zwei Segmente mit amorphem Zellwachstum im inneren Teil des Querschnittes zu sehen. Der gebildete Kallus zeichnet sich durch kleine, nicht oder kaum gestreckte, undifferenzierte Zellen aus, die sich - wie im linken Bild zu sehen - intensiv teilen. Die außenliegende Koleoptile besteht aus großen, gestreckten Zellen, die keine Teilungsaktivität zeigen.



**Abbildung 29: Segmente mit Epidermisgewebe nach sieben Tagen Kallusinduktion**

**links: Aufnahme mit dem Rasterelektronenmikroskop, rechts: vertikaler Schnitt des oberen Bereiches eines Querschnitts (10x)**

Im linken Bild der Abbildung 29 ist ebenfalls die Koleoptile und deren unveränderte Schnittfläche zu erkennen. Der obere kuppelähnliche Bereich wird von Epidermisgewebe gebildet, darunter scheint sich Kallus zu entwickeln. Die rechte Aufnahme zeigt ein anderes Segment, welches ebenfalls Epidermisgewebe nach außen geschoben hat, unter dem sich stark teilende, kleine Zellen befinden. Im Zentrum dieses Gebildes sind gestreckte, differenzierte Zellen zu erkennen.



**Abbildung 30: Segment mit totem Gewebe nach sieben Tagen Kallusinduktion**

**links: Aufnahme mit dem Rasterelektronenmikroskop von oben auf den Querschnitt, rechts: vertikaler Schnitt eines Querschnitts (10x)**

Das linke Segment in Abbildung 30 besteht in der Mitte aus Blattgewebe, welches sich nach der Präparation noch gestreckt hat. Dieses ist von der röhrenförmigen Koeoptile umgeben, die auch hier keine Veränderung zeigt. Es wurde kein Kallus gebildet. Im rechten Bild sind ebenfalls angeschnittene ältere Blätter zu erkennen. An deren Schnittende haben sich einige Zellen angefangen zu teilen, sind aber vergleichsweise wenig teilungsaktiv und mehr differenziert als der Kallus aus Abbildung 28 und 29. Der mittlere Bereich besteht aus totem Gewebe.

### 3.3 Gentransfer in Sprosssegmentkallus mittels *A.tumefaciens*

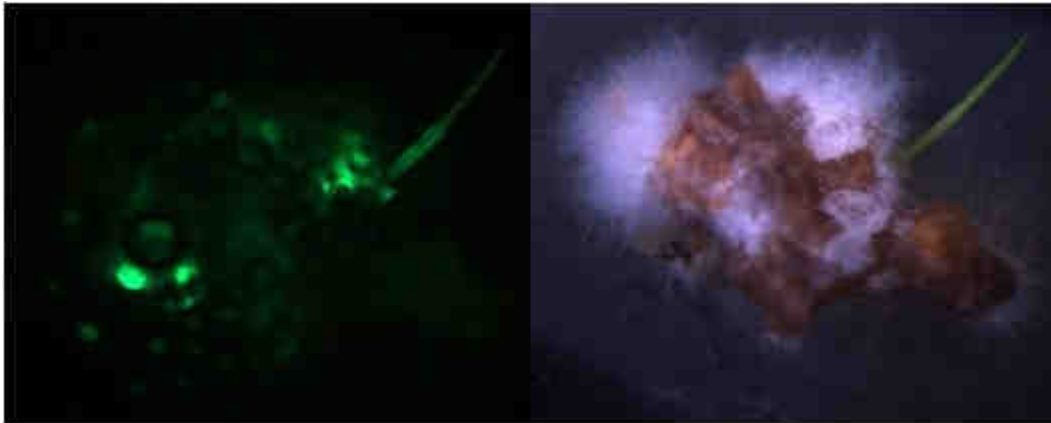
Um für die neu entwickelte Regeneration aus *B.distachyon*-Sprosssegmentkallus eine Methode für die genetische Transformation zu etablieren, bot es sich an, bereits für andere Explantattypen von Gräsern bewährte Transformationsprotokolle zu testen und später gezielt einzelne Parameter zu variieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher die in der Arbeitsgruppe „Pflanzliche Reproduktionsbiologie“ (IPK Gatersleben) etablierten Protokolle für den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer in unreife Embryonen (uE) von Gerste bzw. Mais zu Grunde gelegt (Hensel *et al.*, 2009). Darüber hinaus wurden drei Varianten für den Gentransfer in embryogenen Kallus aus uE von *B.distachyon* publizierten Protokollen abgeleitet (Păcurar *et al.*, 2008; Vogel und Hill, 2007). Die Vorkultur, Selektionsphase und Regeneration erfolgten - wie unter 2.2.3 beschrieben - auf den für *B.distachyon* Sprosssegmente etablierten Medien CIM<sub>B</sub>(11) und CIM<sub>B</sub>(22) sowie K4N-Medium (RM) (Rezeptur siehe Anhang).

#### 3.3.1 Anwendung eines modifizierten Protokolls für unreife Gerstenembryonen (Variante 1)

Nach drei Wochen Vorkultur der Segmente auf CIM<sub>B</sub>(22) war es noch nicht möglich, eindeutig die Kalli zu identifizieren, die sich später zum Typ II entwickelten bzw. somatische Embryonen ausbilden. Deshalb wurde jeder Kallus, der größer als 2 mm war, für die Inokulation verwendet. Nach der Infektion mit den Agrobakterien und zwei Tagen in flüssiger Co-Kultur waren die Kalli sehr weich und mit Flüssigkeit vollgesaugt und besaßen eine gräuliche Färbung. Die Kalli zeigten auf CIM<sub>B</sub>(22)-Selektionsmedium kein Wachstum, färbten sich aber trotz Anwesenheit von Hygromycin B nicht dunkelbraun bzw. schwarz. Trotz Anwesenheit des Antibiotikums Timentin blieben die Kalli mit Agrobakterien kontaminiert und wurden teilweise überwachsen. Lediglich ein Kallus von 94 verarbeiteten Sprossen proliferierte nach einigen Wochen und wies grüne Fluoreszenz bei Anregung mit UV-Licht auf. Nach Kultivierung auf RM bildete sich ein chlorophyll-

haltiger Spross, der aber mit dem Kallus durch eine Pilzkontamination abstarb (Abbildung 31). Bei anderen Kalli konnte keine GFP-Expression detektiert werden. Diese Kulturen wurden deshalb neun Wochen nach der Inokulation verworfen.



**Abbildung 31: GFP-Nachweis im regenerierenden Kallus aus Transformationsvariante 1 (mit Pilzbefall)**

**Links: GFP-Expression von Kallus und Spross unter UV—Licht, mit GFP-Plus-Filter (Leica); rechts: Hellfeld-Aufnahme**

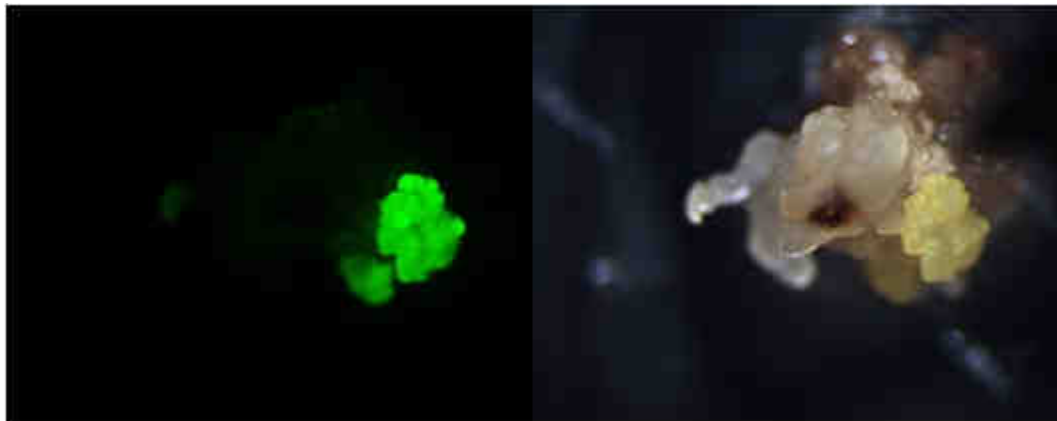
### **3.3.2 Anwendung eines modifizierten Protokolls für unreife *B.distachyon*-Embryonen (Variante 2a-2c)**

#### **Variante 2a**

Auch in diesem Versuch konnten nach drei Wochen Vorkultur noch keine embryogenen Strukturen identifiziert werden. Nach der Inokulation mit den Agrobakterien ( $OD_{600} = 1,0$ ) wurde die überschüssige Suspension auf Filterpapier abgetupft. Während der Co-Kultur überwucherten die verbliebenen Agrobakterien den Kallus sehr stark, weshalb sie vor der Selektionsphase kurz mit Timentin-haltigem (300mg/l)  $H_2O$  (steril) gespült wurden. Dies konnte aber nicht weitere Kontaminationen verhindern und führt zum Absterben der Kalli. Es konnte von 66 verarbeiteten Sprossen kein Kallus mit GFP-Expression erhalten werden.

### Variante 2b

Aufgrund der Probleme mit den persistierenden Agrobakterien in den vorangegangenen Versuchen und der Verwendung einer höheren Agrobakteriendichte ( $OD_{600} = 1,7-2,0$ ) als in Variante 2a wurden die Kalli nach der Inokulation 15 min mit sterilem  $H_2O$  gespült und danach auf Filterpapier abgetrocknet. Die Kalli zeigten die erste Woche auf Selektion kein Wachstum und wurden teilweise nekrotisch. Trotz des Spülens nach der Inokulation kam es in der Selektionsphase immer wieder zu Agrobakterienbewuchs. Nur vereinzelt konnten kleine Bereiche mit GFP-Expression detektiert werden, die aber im Laufe der Zeit immer weniger wurden. Von 118 verarbeiteten Sprossen konnten drei Kalli mit GFP-exprimierenden somatischen Embryonen erhalten werden (Abbildung 32). Durch immer wiederkehrenden Agrobakterienbefall mussten alle Kalli verworfen werden bevor sie in der Lage waren Regenerate zu bilden.

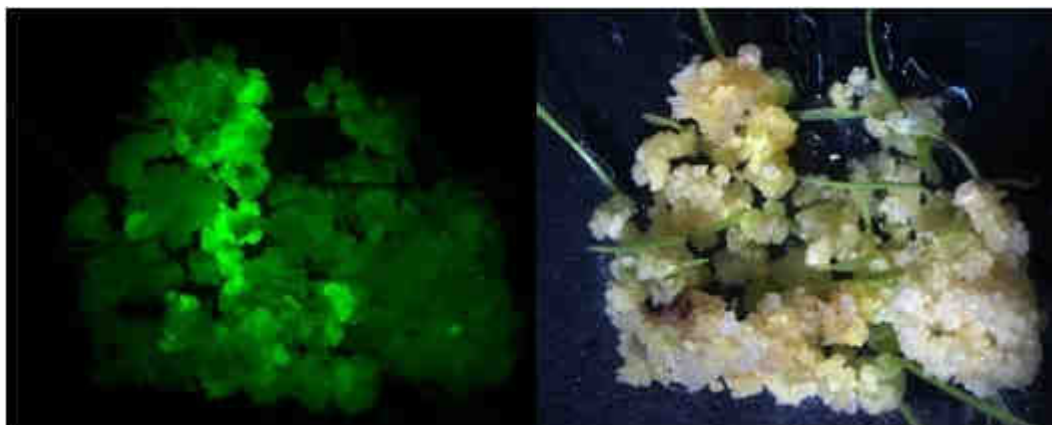


**Abbildung 32:** GFP-Nachweis in somatischen Embryonen eines Kallus aus Transformationsvariante 2b

**Links:** GFP-Expression des Embryos unter UV—Licht, mit GFP-Plus-Filter (Leica); **rechts:** Hellfeld-Aufnahme

### Variante 2c

Aufgrund der geringen Erfolge der vorhergehenden Transformationsvarianten wurde die Vorkultur auf 4-5 Wochen erhöht und die Dichte der Agrobakterien auf 0,6 bei 600 nm reduziert. Zusätzlich wurden die Kalli kurz bei 500mbar mit der Suspension infiltriert. Es konnte beobachtet werden, wie einige Kalli teilweise schwarzbraune Stellen bekamen und sich andere Bereiche hingegen weiter teilten. Eine GFP-Expression ist nach zwei Wochen in 26 und nach 4,5 Wochen nur noch in 16 Kalli von 128 Sprossen zu sehen gewesen. Davon bildeten elf Kalli eine krümelige Struktur aus (Typ II) und wurden daraufhin nach sieben Wochen Selektion auf RM transferiert. Vor persistierenden Agrobakterien konnten nur zwei Kalli bewahrt werden und Pflanzen regenerieren.

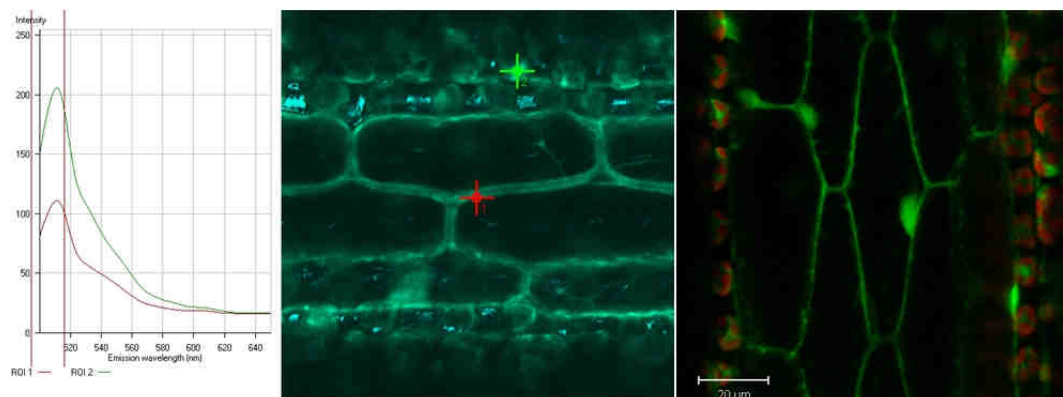


**Abbildung 33: GFP-Nachweis in regenerierendem Kallus aus Transformationsvariante 2c**

**Links: GFP-Expression einiger Bereiche des Kallus unter UV—Licht, mit GFP-Plus-Filter (Leica); rechts: Hellfeld-Aufnahme**

Der in Abbildung 33 gezeigte Kallus bildete über 60 Pflanzen, von denen 40 in Erde gebracht und unter den in 2.1.1 angegebenen Bedingungen kultiviert wurden. Frischblattproben von 25 Pflanzen werden mit dem konfokalen Laser Scanning-Mikroskop (Zeiss LSM 510 Meta, Carl Zeiss, D) auf GFP-Expression untersucht (2.2.3.4). In allen getesteten Blattproben konnte das Reporterprotein nachgewiesen werden.





**Abbildung 34: GFP-Nachweis in der Frischblattprobe eines Regenerates aus Variante 2c**

Aufgenommen mit dem konfokalen Laser Scanning-Mikroskop, (Zeiss LSM 510 Meta, Carl Zeiss AG, D). Anregungswellenlänge= 488 nm, Bandpassfilter (505-530 nm) für GFP und Langpass-Filter (680 nm) für Chlorophyll, links: Emissionsspektrum der markierten Bereiche der Epidermis mit dem dazugehörigen Blattabschnitt, rechts: grüne Autofluoreszenz in den Zellkernen und an der Zellmembran sowie rote Autofluoreszenz des Chlorophylls.

Abbildung 34 zeigt den Ausschnitt eines der untersuchten Blätter mit dem dazugehörigen Emissionsspektrum. Beide markierten Bereiche weisen eine erhöhte Intensität, bei der für das GFP-Protein typischen Emissionswellenlänge (512 nm), auf. Die Zellmembranen und Zellkerne fluoreszieren besonders stark.

Das regenerierte Pflänzchen des anderen Kallus starb nach der Überführung in Erde ab. Somit konnte von 128 verarbeiteten Sprossen nur ein Kallus mit mehreren überlebensfähigen Regeneraten gewonnen werden.

### 3.3.3 Anwendung eines modifizierten Protokolls für unreife Maisembryonen (Variante 3)

Für diese Methode wurden Kalli unterschiedlichen Alters verwendet, um zu sehen, ob dies eine Auswirkung auf die Transformationseffizienz hat, da aber auch in diesem Versuch häufige auftretende Kontaminationen mit Agrobakterien- zum Absterben von Explantaten führten, kann keine Aussage zur Abhängigkeit des Gentransfers von der Dauer der Vorkultur getroffen werden.

Auf dem Selektionsmedium wurde ein Großteil des Kallusgewebes nekrotisch. Dennoch fingen bei einigen Kalli, ungefähr ein bis zwei Wochen nach der Co-Kultur, kleine Bereiche an zu proliferieren. Zwei Wochen nach der Infektion mit den Agrobakterien konnte an fast jedem Kallus GFP-Expression detektiert werden, die entweder kleine flächige Bereiche oder teilweise nur punktuell einzelne Zellen umfassten (Abbildung 35). Im Laufe der Zeit reduzierte sich jedoch die Zahl der Kalli mit GFP-Expression oder sie waren nicht in der Lage zu proliferieren, sondern verharrten in dem Entwicklungsstadium, das sie zum Zeitpunkt der Inokulation erreicht hatten. Abbildung 35 zeigt einige Kalli mit unterschiedlichen Gewebestrukturen und GFP-Expression ca. sieben Wochen nach der Inokulation.

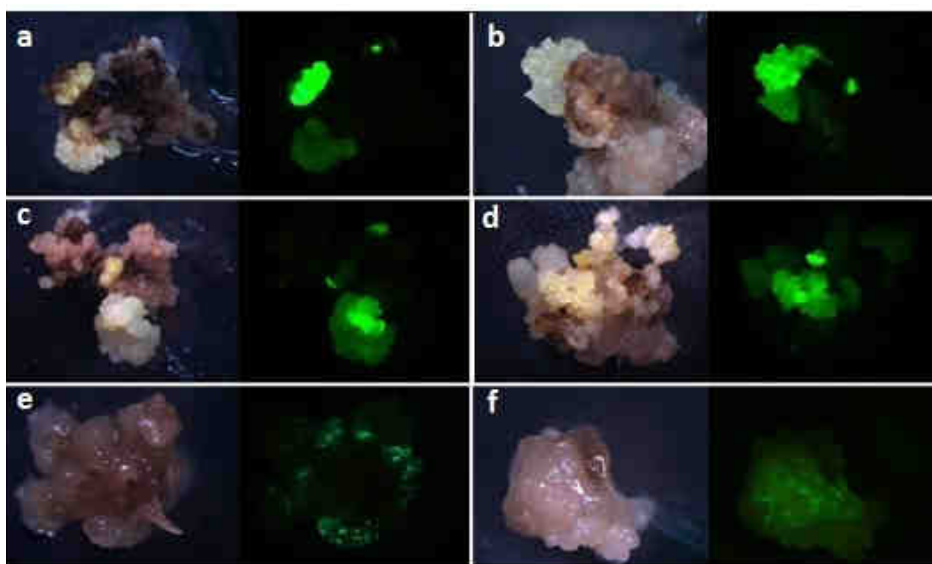


Abbildung 35: GFP-Nachweis in Kalli aus Transformationsvariante 3.

**a–d: Kallus mit verbräunten und gesunden, embryogenen, GFP-exprimierenden Bereichen, e+f: kompakter Kallus mit einzelnen GFP-exprimierenden Zellen, ohne Anzeichen von Teilung oder embryogenem Gewebe**

Die vitalen Bereiche der Kalli a-d zeigen eine intensive grüne Fluoreszenz unter UV-Licht und besitzen eine krümelige Struktur. Teilweise sind schon erste somatische Embryonen zu erkennen. Die Kalli e und f weisen ebenfalls GFP-Expression auf, jedoch ist diese auf einzelne kleine Stellen beschränkt und das Kallusgewebe ist grau, kompakt und wächst nicht mehr.

Von anfänglich 291 verarbeiteten Sprossen konnten insgesamt 72 Kalli mit embryogenen Strukturen auf RM mit 25 mg/l Hygromycin transferiert werden. Ein Teil davon starb durch Kontaminationen mit Agrobakterien trotz mehrfachen Spülens mit Timentin und Medienwechsel im weiteren Kulturverlauf ab. Bis zum Abbruch der Regenerationsphase 15-19 Wochen nach der Transformation konnten insgesamt 205 Regenerate von 42 unabhängigen Kalli mit GFP-Expression in Erde gebracht werden, wobei von einem Kallus max. 24 Pflänzchen entnommen wurden. Die Überlebensrate, Fertilität und Transgenität der Regenerate konnte nicht mehr untersucht werden, da die für experimentelle Arbeiten zur Verfügung stehende Zeit abgelaufen war.

### 3.4 Molekularbiologische Arbeiten

Im Rahmen einer Praktikumsarbeit wurden schon erste Versuche zum *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer in *B.distachyon*-Sprosssegmentkallus durchgeführt (Melzer, 2009). Für die Transformation wurde das Binärplasmid pTwin GUS+HPT:GFP verwendet (Abbildung 17), welches *HPT* und *sgfp* auf einer T-DNA und *gus* mit Intron auf einer anderen T-DNA trägt (2.2.4). Es konnten insgesamt 22 Primärtransgene ( $T_0$ ) von neun unabhängigen Kalli gewonnen werden. Der molekularbiologische Nachweis des Transgens konnte damals aus Zeitgründen nicht mehr erfolgen und wurde deshalb im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit an jeweils 15 Nachkommen der ersten Generation ( $T_1$ ) von zwei Regeneraten aus unabhängigen Transformationsexperimenten (5 und 13) und zwei Regeneraten (1 und 2), die aus dem selben Kallus gebildet wurden, durchgeführt. Trotz der möglichen Verwandtschaft zweier Pflanzen wird im Weiteren von Linien gesprochen. Die vier Linien wurden ausgewählt, weil von ihnen ausreichend Saatgut zur Verfügung stand. Die angezogenen  $T_1$ -Pflanzen zeigten keine morphologischen Auffälligkeiten und waren alle in der Lage, neues Saatgut ( $T_2$ ) zu produzieren (Anzuchtbedingungen siehe 2.1.1).

#### 3.4.1 Nachweis der Hygromycinresistenz in Blattsegmenten (HYG-Test)

Um die hygromycinresistenten Nachkommen der ausgewählten Primärtransgene identifizieren zu können, wurde der HYG-Test durchgeführt. Abbildung 36 zeigt die Blattsegmente nach der Behandlung. Die rot markierten Blattstücke besitzen entweder eine ausgebleichene Blattbasis oder sind auffällig dunkel gefärbt und werden als nicht resistent eingeordnet. Die übrigen Blattsegmente sind teilweise nur am oberen Ende, das sich nicht im Medium befand, rostbraun gefärbt und sonst unverändert grün. Jene werden als resistent eingestuft. Von 15 Nachkommen wurden in Linie 1 neun, in Linie 2 elf, in Linie 5 zwei und in Linie 13 elf anhand der getesteten Blattsegmente als resistent gegenüber Hygromycin B identifiziert. Der Wildtyp zeigt erwartungsgemäß keine Resistenz.

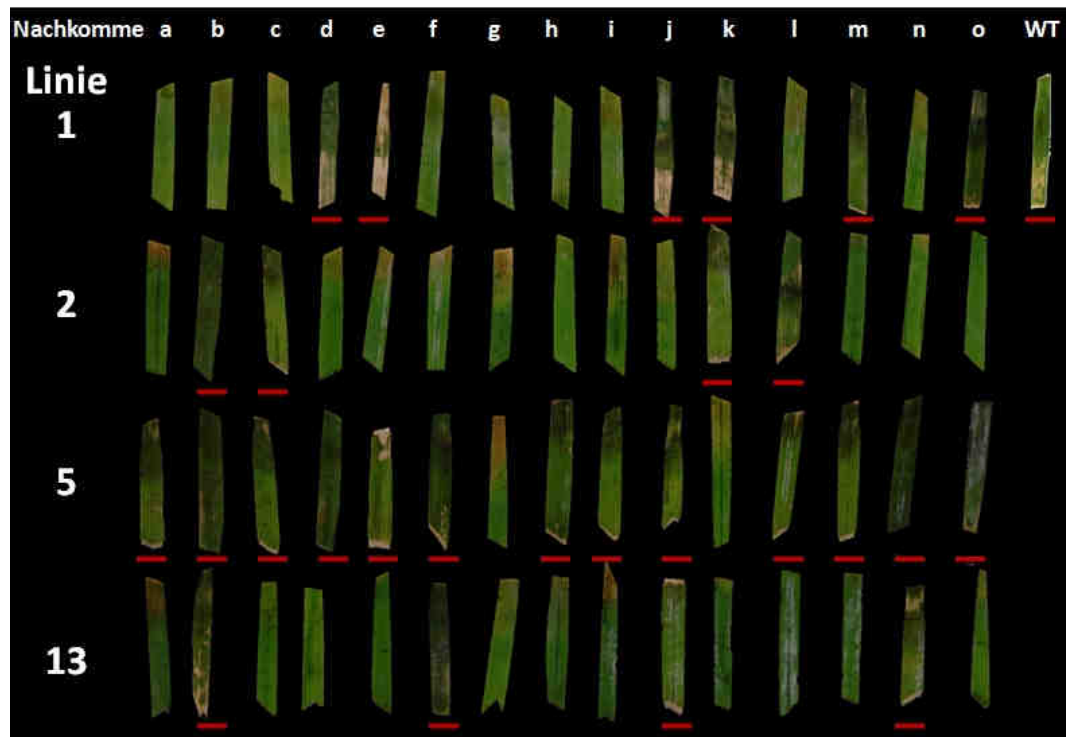


Abbildung 36: Nachweis von HPT mittels Hygromycin-Blatttest

Blattstücke der jeweils 15 Nachkommen (a-o) aus vier mit *LBA4404/pSB1* (pTwin GUS+HPT:GFP) transformierten Linien nach sieben Tagen. Sie wurden zur Hälfte in flüssigem MS-Medium mit 200 mg/l Hygromycin B für sieben Tage kultiviert. Rot markierte Segmente wurden als anfällig gegen Hygromycin B eingestuft; WT=Wildtyp

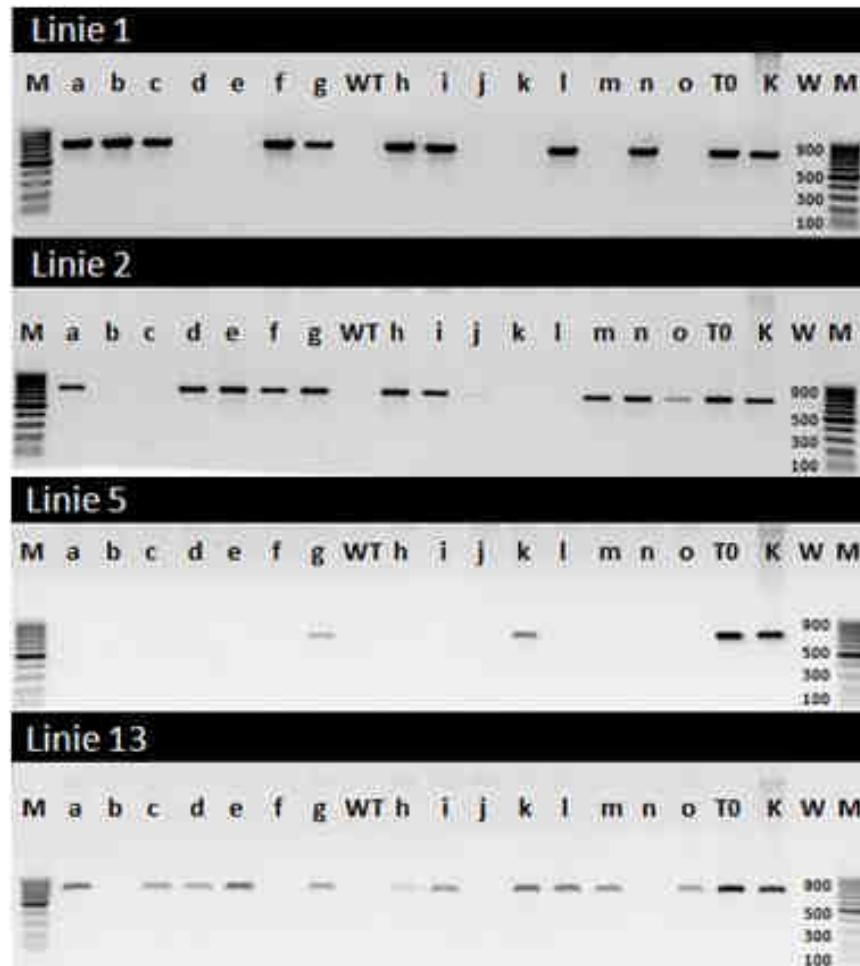
### 3.4.2 Histochemischer Nachweis der *gus*-Expression (GUS-Assay)

Der Nachweis auf die GUS-Reportergenaktivität in den Nachkommen erfolgte über den histochemischen GUS-Assay. Nach der Inkubation frischer Blattsegmente mit  $\alpha$ -Gluc-Lösung und dem Herauslösen des Chlorophylls konnte keine Blaufärbung des Gewebes nachgewiesen werden. Auch die Wiederholung mit Wurzelspitzen brachte kein positives Ergebnis.

### 3.4.3 Nachweis des *HPT*-Gens mittels PCR und Gelelektrophorese

Zusätzlich zu dem Nachweis der Expression von HPT sollte die Anwesenheit der *HPT*-Sequenz durch ihre Amplifikation mittels PCR unterstützend gezeigt werden. Die PCR mit den spezifisch in der *HPT*-Sequenz bindenden Oligonukleoti-

den und die anschließende gelelektrophoretischer Auftrennung brachte das in den Abbildung 37 dargestellte Ergebnis.



**Abbildung 37:** Nachweis des mit PCR amplifizierten *HPT*-Sequenzfragmentes (707 bp) mittels gelelektrophoretischer Auftrennung.

Gelelektrophorese mit 0,8%igem (w/v) Agarosegel (0,12 mg/l Ethidiumbromid). Getestet wurden die Nachkommen ( $T_1$ ) a – o der Primärtransgenen 1, 2, 5 und 13 ( $T_0$ ); WT= Wildtyp, K=Positivkontrolle (stabil mit pTwin GUS+HPT:GFP transformierte Gerstenpflanze), W= Wasser, M= Größenstandard 100 bp DNA Ladder

Analog zum HYG-Blatt-Test konnten für Linie 1 neun, Linie 2 elf, Linie 5 zwei und Linie 13 elf von jeweils 15 getesteten Pflanzen positiv auf *HPT* getestet werden. Wasserprobe und Wildtyp zeigten keine Banden. Die Positivkontrolle und die primärtransgene Pflanze ( $T_0$ ) besitzen die gleiche Fragmentgröße wie deren positive Nachkommen (707 bp).

### 3.4.4 DNA-Gel-Blot-Analyse

Der Nachweis für die stabile Integration der T-DNA mit *HPT* und *sgfp* in das Pflanzengenom und deren Segregation in der T<sub>1</sub>-Generation wurde mit einem Gel-Blot-Hybridisierungsexperiment geführt. Die genomische DNA wurde mit *Hin*-DIII enzymatisch gespalten und anschließend eine Hybridisierung mit der DIG-markierten Sonde gegen die *sgfp*-Sequenz durchgeführt (2.2.4.5). Das Ergebnis ist in Abbildung 38 dargestellt.

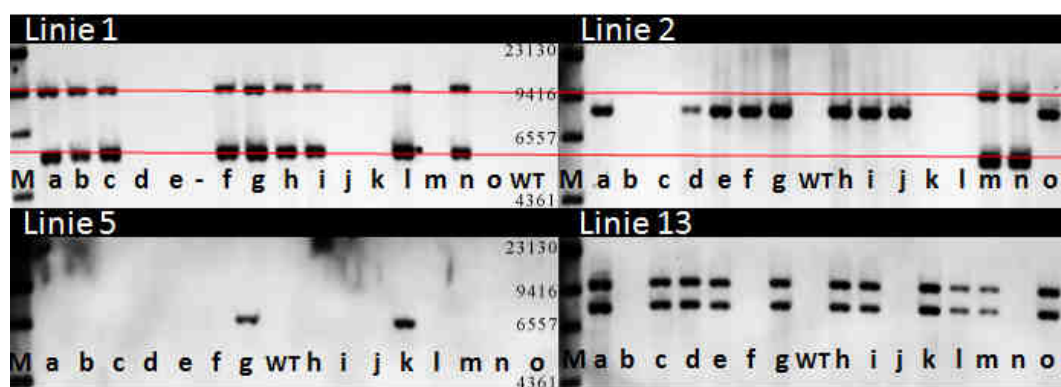


Abbildung 38: Southern-Blot Analyse der T<sub>1</sub> Generation

Analyse der Nachkommen a-o der Linien 1, 2, 5 und 13 mit einer DIG-*sgfp*-Sonde; die rote Linie verweist auf gleiche Bandengrößen einiger Individuen von Linie 1 und 2; M=DIG-Marker II; WT=Wildtyp

Die Hybridisierung ergab, dass Linie 1 neun von 15 Nachkommen besitzt, die jeweils eine Bande von ca. 9,5 kb Größe und eine etwas stärkere von ca. 5,5 kb aufweisen. Linie 2 besitzt neun Nachkommen mit einer Bande bei ungefähr 8 kb und zwei Pflanzen mit dem gleichen Bandenmuster wie die neun aus Linie 1. Linie 5 besitzt zwei Nachkommen mit jeweils einer Bande bei ca. 6,5 kb und der Southern von Linie 13 zeigt 11 Nachkommen die eine Bande bei ungefähr 8 kb und eine weitere bei 9,5 kb besitzen.

### 3.4.5 Gegenüberstellung der Nachweisergebnisse

Der Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Nachweise zeigt, dass alle im Southern-Blot positiv auf *sgfp* getesteten Pflanzen auch bei der PCR und dem Blatttest positiv auf das Vorhandensein des *HPT*-Gens getestet werden konnten. In allen untersuchten Nachkommen der T<sub>0</sub>-Linien konnte jedoch keine GUS-Expression nachgewiesen werden.

**Tabelle 9: Zusammenfassung der Testergebnisse aus 3.4 ohne GUS-Assay.**

+ = positives Testergebnis; -- = negatives Testergebnis; 1 = eine Kopie, 2 = zwei Kopien

<i>Linie</i>	<i>Test</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>	<i>h</i>	<i>i</i>	<i>j</i>	<i>k</i>	<i>l</i>	<i>m</i>	<i>n</i>	<i>o</i>
<b>1</b>	HYG-Blatttest	+	+	+	--	--	+	+	+	+	--	--	+	--	+	--
	hpt- PCR	+	+	+	--	--	+	+	+	+	--	--	+	--	+	--
	GFP-	+	+	+			+	+	+	+			+		+	
	Southern	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	--	--	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	--	--	<b>2</b>	--	<b>2</b>	--
<b>2</b>	HYG-Blatttest	+	--	--	+	+	+	+	+	+	+	--	--	+	+	+
	hpt- PCR	+	--	--	+	+	+	+	+	+	+	--	--	+	+	+
	GFP-	+			+	+	+	+	+	+	+			+	+	+
	Southern	<b>1</b>	--	--	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	--	--	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
<b>5</b>	HYG-Blatttest	--	--	--	--	--	--	+	--	--	--	+	--	--	--	--
	hpt- PCR	--	--	--	--	--	--	+	--	--	--	+	--	--	--	--
	GFP-							+				+				
	Southern	--	--	--	--	--	--	<b>1</b>	--	--	--	<b>1</b>	--	--	--	--
<b>13</b>	HYG-Blatttest	+	--	+	+	+	--	+	+	+	--	+	+	+	--	+
	hpt- PCR	+	--	+	+	+	--	+	+	+	--	+	+	+	--	+
	GFP-	+		+	+	+		+	+	+		+	+	+		+
	Southern	<b>2</b>	--	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	--	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	--	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	--	<b>2</b>



## 4 Diskussion und Ausblick

### 4.1 Klonierung

Für die Entwicklung und Etablierung eines Transformationssystems für Pflanzenzellkulturen ist die Verwendung von Selektionsmarker- und Reportergenen unabdingbar. Als Selektionsmarker werden am häufigsten Antibiotika- oder Herbizid-Resistenzen und als Reportergene histochemisch oder visuell nachweisbare Proteine, wie zum Beispiel: GUS ( $\beta$ -Glucuronidase aus *E.coli*, welches durch Hydrolyse von X-gluc und der Oxidation des Reaktionsproduktes eine Indigo-Blaufärbung hervorruft), GFP (grün fluoreszierendes Protein der Tiefseequalle *Aequorea victoria*) oder DsRed (rot fluoreszierendes Protein drFP583 aus Scheibenkorallen der Spezies *Discosoma*), verwendet.

Die unterschiedlichen Testmethoden für die Expression der Reportergene - wie Fluoreszenzmessung oder GUS-Assay - haben je nach Anwendung ihre Vor- und Nachteile. So eignet sich zum Beispiel die GUS-Färbung nicht, wenn aus dem transformierten Kallus noch Pflanzen regeneriert werden sollen, da die Zellen durch die Behandlung mit der X-Gluc-Lösung abgetötet werden. Für den Nachweis der Glucuronidase in Pflanzenexplantaten ist der GUS-Assay aber eine empfindliche und zuverlässige Methode.

Die Vorselektion von GFP-exprimierenden Kalli nach der Transformation ist hingegen eine praktikable Handhabung, wenn diese weiter kultiviert werden sollen. Allerdings ist es in manchen Pflanzengeweben, wie zum Beispiel in Blättern, schwer die GFP-Expression ohne Emissionsmessung mit der unter 2.2.3.3 beschriebenen Methode von Hintergrundfluoreszenz zu unterscheiden.

Die Binärplasmide, die für bisherige Arbeiten zur Verfügung standen, besaßen entweder nur diese Kombination, aus einem Selektionsmarker und einem Reportergen oder enthielten *HPT*, *gus* und *sgfp*, wobei aber nur *HPT* und *sgfp* gekoppelt vererbt werden und *gus* auf einer separaten T-DNA liegt (siehe 2.2.4 pTwin

GUS+HPT:GFP), also partikulär übertragen werden kann. Dieses System wurde ursprünglich für die Erzeugung von selektionsmarkerfreien Pflanzen entwickelt. Es birgt jedoch die Limitation, dass die Zellen in denen nur die T-DNA mit dem *gus*-Reportergen integriert wurde bei Hygromycin-Selektion nicht überleben und im umgekehrten Falle der Nachweis von *sgfp* nicht die Anwesenheit von *gus* bedeutet.

Dies wurde zum Anlass genommen einen Vektor zu entwickeln, der neben der unabdingbaren Resistenz, hier die durch das *HPT*-Gen vermittelte Resistenz, wahlweise den Nachweis über GUS-Assay und GFP-Expression ermöglicht. Es wurde hierfür eine translationale Fusion (*egfp:gus*) der codierenden Sequenzen des *enhanced green fluorescent protein* Gens und des  $\beta$ -Glucuronidase-Gens verwendet.

Die Erstellung des Binärvektors sollte über den Zwischenvektor pBM152 erfolgen, der zunächst erfolgreich aus den Ausgangsplasmiden pGH219-2 und pUbi-AB-M erzeugt wurde. Dieser Vektor enthält das *egfp:gus* Fusionsprotein, welches von den *UBI-1*-Promotor und einem 35S-Terminator reguliert wird. Um einen negativen Einfluss der MCS und weiterer Basen zwischen Promotor und Protein auszuschließen, wurde die Funktionalität des Fusionsproteins im Kontext der oben genannten, regulierenden Elemente anhand transienter Expression in Gerstenembryonen untersucht. Einen Tag nach Partikelbeschuss der Embryonen konnte die Expression von *egfp:gus* visuell detektiert werden, was bedeutet, dass das Fusionsgen erfolgreich in den Zellen transkribiert und translatiert wird und volle Funktionalität aufweist.

Im weiteren Verlauf der Arbeiten konnte durch partielle Restriktion des Zwischenvektors das Fusionsprotein mit dem *UBI-1*-Promotor und 35S-Terminator isoliert werden. Diese Expressionskassette sollte in den Binärvektor p6int-Ubi integriert werden, auf dem sich das *hpt*-Selektionsmarkergen mit dem *ST-LSI*-Intron unter der Kontrolle des *UBI-1*-Promotors und des *CaMV35S*-Terminators, befindet. In der gegebenen Zeit konnten jedoch keine Kolonien mit dem

gewünschten Ligationsprodukt pBM279 selektiert werden. Die genaue Ursache dafür ist nicht bekannt, es wird aber vermutet, dass Vektor- und Insert-DNA nicht im angestrebten Verhältnis von 1:3 vorgelegen haben, da nur eine grobe Abschätzung der DNA-Konzentration anhand der Bandenstärke im Agarosegel mit dem Größenstandard getroffen wurde. Weiterhin denkbar wäre ein Defekt der Fragmentenden durch die Auftrennung im Agarosegel bzw. die Einwirkung von UV-Strahlung, die zum Sichtbarmachen der DNA notwendig war. Eine schlechte Kompetenz der *E.coli*-Zellen konnte durch eine Kontrolltransformation mit p6int-Ubi ausgeschlossen werden. Aus Zeitgründen konnte der Versuch im Rahmen dieser Arbeit nicht noch einmal wiederholt werden, aber die Erstellung des Binärplasmids sollte mit höheren DNA-Konzentrationen und einem genauer eingestellten Vektor-Insert-Verhältnis möglich sein.

## **4.2 Pflanzengewebekultur**

### **4.2.1 Oberflächensterilisation und Keimung**

Ein großes Problem bei der Verwendung reifer Körner von Gewächshauskulturen stellte die Kontamination mit Bakterien, Hefen und vor allem Pilzsporen dar, die mit der anfänglich verwendeten Oberflächensterilisation (OS) (2,4% (v/v) NaOCl 15 min), nicht verhindert werden konnte. Die zusätzliche Vorbehandlung mit 70% (v/v) Ethanol wirkte sich dabei auffällig schlecht auf die Keimrate aus. Die 3-minütige Behandlung schien dabei ausreichend zu sein, um den Keimling zu schädigen, obwohl unreife Gersten- und Weizenkaryopsen ebenfalls nach dieser Methode vorbehandelt werden, um später die uE heraus zu präparieren (Hensel *et al.*, 2009). Ursache für diese Empfindlichkeit könnte die vorangegangene Quellung der Körner sein, während der die Sprossspitze sich bereits nach außen schieben kann und ungeschützt frei liegt. Von der Anwendung von 0,1% (v/v) HgCl<sub>2</sub> für 4 min wurde Abstand genommen, da dieses starke OS-Mittel sehr toxisch ist und spezielle Vorsichtsmaßnahmen bei Umgang und Entsorgung erfordert.

Die OS für 10 min mit 6% (v/v) NaOCl wird für zukünftige Versuche empfohlen. Die Keimrate liegt für entspelzte Körner zwar nur bei 70-80%, dies stellt aber im Verhältnis zum Material- und Zeitverlust bei einer Kontamination einen guten Kompromiss dar, denn das Problem ist nicht allein, dass Bakterien, Hefen und Pilze auftreten, sondern die Kontaminationen oft erst nach dem Verarbeiten und einigen Tagen Kultur sichtbar werden.

### **4.2.2 Kallusinduktion und Regeneration**

Grundlage für die Etablierung eines neuen Transformationssystems ist eine effiziente Methode zur Gewinnung von embryogenen Kalluskulturen, die eine möglichst hohe Kompetenz zur Regeneration aufweisen. Denn ein gutes Gewebekultursystem erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass auch nach der stressintensiven Behandlung mit Agrobakterien und der Selektion noch genügend Regenerationspotential vorhanden ist und somit eine Vielzahl an putativ transgenen Regenraten

erhalten werden kann. Um dies zu erreichen wurde versucht die Effizienz der Kallusinduktion in Hinblick auf Embryogenität und Regenerierbarkeit durch Variation diverser Parameter zu optimieren.

### 4.2.2.1 Reproduktion der Kallusinduktion und Regeneration

Grundlage für die vorliegende Studie waren die im Vorfeld erarbeiteten Standardvarianten CIM<sub>B</sub>(11) und CIM<sub>B</sub>(22), mit denen die Methode zunächst reproduziert und die mittlere Ausbeute an eK und rK pro Spross ermittelt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass aus Segmenten junger *B.distachyon* Sprösslinge cremig-weißer, krümeliger Kallus gewonnen werden kann, der dem aus reifen Karyopsen und unreifen Embryonen entspricht. Dieser wurde 1995 zuerst durch Bablak und Kollegen für *B.distachyon* beschrieben und von Draper *et al.* (2001) als Typ II bezeichnet. Er beginnt sich nach ca. 3-4 Wochen aus amorphem, weißem, weichem Kallus zu entwickeln. Vogel und Hill (2007) konnten mit der Inzuchtlinie Bd21-3 nur von 5% der unreifen Körner eK gewinnen, hingegen bildeten - zudem drei Wochen schneller - 94% der kleinen (<0,3 mm) unreifen Embryonen (uE) embryogenen Kallus. Die Kallusentwicklung und Ausbildung embryogener Strukturen schien auch bei den Sprosssegmenten etwas langsamer von statten zu gehen, als bei den uE. So konnten unter den gegebenen Bedingungen selten bereits nach drei Wochen Kultur von Sprosssegmenten eK ausgemacht werden. Dies kann zum einem an dem höheren Differenzierungsgrad der Explantate liegen, zusätzlich könnte auch die Kultivierung bei 24°C statt den von Vogel und Hill verwendeten 28°C die Ursache dafür sein. So konnten Vogel, Leong und Hayden (2006) bereits zeigen, dass sich der Kallus bei 28°C schneller entwickelt, als bei 22°C. Dennoch konnten nach 7-8 Wochen auf CIM<sub>B</sub>(11) und drei Wochen auf RM 90,1% der verarbeiteten Sprosse eK bilden, was zwar vergleichsweise lange dauerte, aber mit der Effizienz der uE vergleichbar ist. Außerdem konnten durch die Anfertigung mehrerer Segmente pro Spross 1,7 eK und durchschnittlich 8,3 Regenrate aus einem ausgekeimten Korn gewonnen werden. Somit ist es später auch möglich ohne lange Vorkulturdauer und Teilung des Kallus mehr als nur einen Kallus pro

Embryo bzw. Spross für den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer bereitzustellen, der zur somatischen Embryogenese befähigt ist.

### 4.2.2.2 Einfluss der 2,4-D-Konzentration im Kallusinduktionsmedium

Das Auxinanalogen 2,4-D ist für die Dedifferenzierung von Pflanzengewebe und die Induktion somatischer Embryogenese geeignet (Fehér, 2006). Es wurde schon in vielen Kulturen getestet und auch für die Produktion von embryogenem (eK) und regenerierendem Kallus (rK) aus unreifen Embryonen bei *B. distachyon* verwendet, wobei die besten Ergebnisse mit 11,25  $\mu\text{M}$  2,4-D erzielt wurden (Babla *et al.*, 1995; Draper *et al.*, 2001, Christiansen *et al.*, 2005; Vogel, Leong und Hayden, 2006; Vogel und Hill, 2007; Vain *et al.*, 2007; Păcurar *et al.*, 2008). Dies deckt sich mit den hier beobachteten Tendenzen, dass mit über diesem Wert liegender 2,4-D Konzentration die Häufigkeiten der Bildung von eK und rK pro Spross abnehmen. Diese Beobachtung lässt sich darauf zurückführen, dass 2,4-D zwar die Kallusentwicklung stimuliert, aber der organisierten Entwicklung der undifferenzierten Zellen zu proembryogenen Massen und somatischen Embryonen hemmt (Murashige, 1974). Die Ursache für das undifferenzierte, verstärkte Wachstum der Zellen erklärt Endress mit der Hypermethylierung der DNA durch das Auxin, welches die Zellen in eine sehr aktive mitotische Phase versetzt (Endress, 1994; Meneses *et al.*, 2005). Zugleich ist aber die Anwesenheit des Auxins für die Initiierung der somatischen Embryogenese notwendig, wobei die darauf folgende Reduktion der Auxinkonzentration die Bildung von Polaritäten in den Zellen zulässt und damit zur Entwicklung von somatischen Embryonen (sE) führen kann (Fehér, 2006). Dieser Effekt und der unterschiedliche Differenzierungsgrad der Zellen verschiedener Segmente würde erklären weshalb im Mittel weniger Kalli bei höheren Konzentrationen von 2,4-D embryogen sind, die Anzahl aber generell nach dem Transfer auf RM, in dem kein 2,4-D enthalten ist, zunimmt. Es ist also zudem denkbar, dass bei Verlängerung der Regenerationsphase generell eine höhere Rate an rK und Regenraten erreicht werden könnte. Die meisten eK, rK und Regenrate pro verarbeiteten Spross aller

Versuche konnten bei der Reduktion der 2,4-D-Konzentration in der Kallusinduktionsphase gewonnen werden. Bei dieser Variante wurde die anfänglich hohe 2,4-D Konzentration (22  $\mu\text{M}$ ) ausgenutzt um die Dedifferenzierung und Proliferation des Kallus zu beschleunigen, die Herabsetzung der Auxinkonzentration nach drei Wochen auf die Hälfte kam hingegen der Ausbildung embryogener Strukturen und der Regenerationsfähigkeit zugute (Murashige, 1974).

### 4.2.2.3 Einfluss der BAP-Konzentration im Kallusinduktionsmedium

Neben 2,4-D wurde das Cytokinin BAP in unterschiedlichen Konzentrationen auf seinen Einfluss bei der Bildung von somatischen Embryonen getestet. Die Verwendung von BAP wurde schon durch Vogel und Kollegen für Embryonenkulturen an *B.distachyon* getestet, dabei konnten aber nur für Linie Bd2, und nicht Bd21, ein positiver Effekt auf die Bildung von eK aus unreifen Embryonen gezeigt werden (Vogel, Leong und Hayden, 2006). So konnte die Gruppe um Vogel mit 1  $\mu\text{M}$  BAP und 4,5  $\mu\text{M}$  2,4-D im Kallusinduktionsmedium im Vergleich zum BAP-freien Medium mit 11,25  $\mu\text{M}$  2,4-D eine 7,5-fache Steigerung der Entwicklung von eK aus reifen Körnern erzielen.

Die in etwa der von Vogel entsprechende Kombination von 1  $\mu\text{M}$  BAP und 5  $\mu\text{M}$  2,4-D führte im Fall von Sprosssegmenten als Ausgangsexplantat im Vergleich zur BAP-freien Standardvariante CIM<sub>B</sub>(11) zu einer signifikant geringeren Bildung von eK. Einerseits könnte durch die geringe 2,4-D-Konzentration die Dedifferenzierung der Explantate und Proliferation der Kalli weniger erfolgreich gewesen sein, andererseits wurde auch bei 0,3  $\mu\text{M}$  BAP in CIM<sub>B</sub>(10) vergleichsweise wenig eK gewonnen, was einen negativen Effekt des BAPs in dieser Konzentrationskombination mit 2,4-D vermuten lässt. Die höheren Mittelwerte an eK und rK bei CIM<sub>B</sub>(10) mit 1  $\mu\text{M}$  BAP bzw. 3  $\mu\text{M}$  BAP können nicht auf das BAP zurückgeführt werden, da der parallel durchgeführte Standard ohne BAP wiederum höhere Ausbeuten zeigte. Somit scheint diese Verbesserung der Kallusinduktion durch andere Faktoren, wie die Qualität der verwendeten Sprosse hervorgerufen

worden zu sein, was jedoch anhand der vorliegenden Daten nicht abschließend geklärt werden kann. Die Wiederholung des Versuches mit größeren Probenumfängen und mehreren unabhängigen Wiederholungen für die höheren BAP Konzentrationen ist daher zu empfehlen, um eindeutigere Aussagen treffen zu können.

### **4.2.2.4 Einfluss zusätzlicher Stickstoffquellen im Kallusinduktionsmedium**

Die Verfügbarkeit von Stickstoff, als wichtiger Bestandteil komplexer organischer Moleküle, ist ein essentieller Faktor in Pflanzenkulturmedien. Da in den verwendeten MS-Salzen (M 0238, Duchefa) Stickstoff ausschließlich in Nitratform (18,8 mM  $\text{KNO}_3$ ) vorhanden ist wurde ermittelt, welchen Effekt zusätzliche Gaben von Ammoniumnitrat bzw. Glutamin haben. Die Verwendung der MS-Salze entsprechend Originalrezeptur mit  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (20,6 mM; Murashige and Skoog, 1962) wirkte sich jedoch signifikant negativ auf die Anzahl gewonnener eK aus. Grund hierfür könnte die toxische Wirkung von Ammoniak sein, das sich im Medium und im Pflanzengewebe anreichert, wenn die Umwandlung von Ammonium in Aminosäuren nicht schnell genug abläuft. Die Akkumulation von Ammonium bzw. Ammoniak kann zusätzlich noch durch Nitrat-Reduktion verstärkt werden, was zudem zu einer Änderung des pH-Wertes führt (George und de Klerk, 2008). Weiterhin kann das Verhältnis von  $\text{NO}_3^-$  zu  $\text{NH}_4^+$  im Medium für verschiedenste Pflanzenarten und Gewebekulturen unterschiedliche regulierende Effekte haben und sich beispielsweise auf die Wirksamkeit von Phytohormonen auswirken (George und de Klerk, 2008). Auch von auch von Viertel und Hess (1996) wurde das  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  Verhältnis als mögliche Ursache für die Stimulation der somatischen Embryogenese bei kultivierten Weizensprossapexen diskutiert. Sie konnten in ihren Versuchen bei Verwendung des ML3-Mediums mit einem  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ -Verhältnis von 89:11, mehr als 90% der Sprossapexe zur Induktion von eK anregen, während es bei 64:36 im MSB-Medium nur 4-12% waren (Viertel und Hess, 1996).



Um genauer klären zu können, in welcher Menge und Balance  $\text{NO}_3^-$  und  $\text{NH}_4^+$  in dem hier für *B.distachyon* entwickelten System die somatische Embryogenese am besten begünstigt, müssten entsprechend weitere Versuche durchgeführt werden.

Nach der Zugabe von Glutamin konnten zwar weniger eK beobachtet werden, was eventuell mit dem Absenken des pH-Wertes durch die Aufnahme der Glutamins erklärt werden könnte, allerdings konnte der Unterschied zum Standard nicht als signifikant nachgewiesen werden und die Menge an rK war in etwa gleich. Die leichte Zunahme der Regenrate pro Spross könnte auf einen förderlichen Effekt der Aminosäure auf die somatische Embryogenese hinweisen. Der verwendete Probenumfang ist allerdings zu gering um eine konkrete Aussage über den Einfluss von Glutamin treffen zu können. Somit wäre es sinnvoll den Versuch in einem größeren Umfang zu wiederholen und gegebenenfalls auch höhere und niedrigere Konzentrationen zu testen.

Um einer Änderung des pH-Wertes durch Aufnahme und Umwandlung verschiedener Substanzen vorzubeugen, könnte die Pufferung des Mediums z.B. mit 2-(N-Morpholino)Ethansulfonsäure (MES) erfolgen (Hunault, 1985).

### **4.2.2.5 Einfluss von $\text{CuSO}_4$ im Kallusinduktionsmedium**

Die Zugabe von  $3,75 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  zum Kallusinduktionsmedium, welches ursprünglich nur  $0,1 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  enthält, sollte die Regenerationsfähigkeit der Kalli erhöhen. Purnhauser und Gyulai (1993) konnten für Weizen und Triticale eine erhebliche Zunahme an rK und Regeneraten durch Addition von  $1-100 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  im Vergleich zu herkömmlichem MS-Medium nachweisen. Auch Vain *et al.* (2008) beschrieben für *B.distachyon* die Zunahme der Pflanzenregeneration über somatische Embryogenese um das Zwei- bis Dreifache durch Ergänzung des Kallusinduktionsmediums mit  $0,6 \text{ mg/l}$   $\text{CuSO}_4$  ( $= 3,75 \mu\text{M}$ ). Diese Ergebnisse konnten im Rahmen dieser Arbeit nur zum Teil erreicht werden. Zwar zeigte die Variante  $\text{CIM}_B(11) + 3,75 \mu\text{M}$  eine höhere Anzahl an Regeneraten pro rK, aber die Menge an rK war im Mittel geringer als bei  $\text{CIM}_B(11)$  und somit war ebenfalls die

Gesamteffizienz an Regeneraten pro Spross geringer. Eine Erklärung für die geringere Ausbeute an eK und rK kann nicht gegeben werden. Zwar kann Kupfer in hohen Konzentrationen toxisch wirken, aber für die hier verwendete  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration wäre das nicht zu erwarten. Bei Weizen und Triticale nahm der prozentuale Anteil der Kalli die Sprosse regenerierten mit der Erhöhung des  $\text{CuSO}_4$ -Gehaltes im Kallusinduktionsmedium bis  $10\text{ }\mu\text{M}$  zu und selbst mit  $100\text{ }\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  wurde nicht weniger rK erhalten als mit  $0,1\text{ }\mu\text{M}$  (Purnhauser, und Gyulai, 1993). Es ist also denkbar, dass der hier beobachtete Effekt nicht auf die Variante selbst zurückzuführen ist. Aufgrund von Kontaminationen wurde der Probenumfang stark dezimiert, wobei und Wiederholungen von einigen Versuchstagen ganz ausfielen. Zudem war wahrscheinlich das für diesen Versuch verarbeitete Material von unzureichender Qualität, da auch der aus derselben Sprosscharge angefertigte Standard eine unterdurchschnittliche Kallusinduktion zeigte und Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Varianten zufälliger Natur gewesen sein könnten. Es ist demzufolge notwendig den Effekt von  $\text{CuSO}_4$  anhand eines aussagekräftigeren Probenumfanges nochmals zu untersuchen.

### **4.2.2.6 Einfluss der Art der Kohlenstoffquelle im Kallusinduktionsmedium**

Ausgehend von bestehenden Protokollen zur Gewinnung von regenerierbaren embryogenen Kalli aus reifen und unreifen Embryonen von *B.distachyon* (Babla *et al.*, 1995; Vogel und Hill, 2007; Vain *et al.*, 2007) wurde Saccharose als Kohlenstoffquelle und Osmotikum getestet. Der Austausch der Maltose durch die gleiche Menge an Saccharose zeigte ein eindeutiges Ergebnis. Während sowohl für 3% (w/v) Saccharose (Babla *et al.*, 1995; Vogel und Hill, 2007; Vain *et al.*, 2007) als auch 3% (w/v) Maltose (Draper *et al.*, 2001; Christiansen *et al.*, 2005) im Kallusinduktionsmedium die Bildung somatischer Embryonen aus Kalluskulturen beobachtet werden konnte und Sidorov *et al.* (2006) im Rahmen ihrer Optimierung des Kallusinduktionsmediums für Maiskeimnodien unter anderem Maltose erfolgreich durch Saccharose ersetzen, hatte die Verwendung von Saccharose in den hier geführten Versuchen mit Sprosssegmenten einen starken negativen Effekt

und führte zu einer veränderten Kallusstruktur. Durch eine parallel geführte Vergleichsprobe kann ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt auf das Donor-material zurückzuführen ist. Eine Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass der schnellere hydrolytische Abbau von Saccharose zu Glucose und Fructose durch die Zellkulturen, starke osmotische Schwankungen hervorgerufen hat und somit den Wasserhaushalt der Kalli störte (Navarro-Alvares *et al.*, 1994). Für Blattbasis-segmente von Hafer konnte ebenfalls die Abnahme an Regeneraten pro Explantat um 15% bei Verwendung von MS-Medium mit Saccharose statt dem L3-Medium mit Maltose für die Kallusinduktion beobachtet werden (Gless *et al.*, 1998). Allerdings kann in diesem Fall auch die generell unterschiedliche Komposition der Medien der Grund für diese Beobachtung gewesen sein, was aber durch Gless und Kollegen nicht genauer untersucht wurde. Für *B.distachyon*-Sprosssegmente ist in der hier getesteten Konzentration Saccharose im Gegensatz zu Maltose im CIM<sub>B</sub> nicht geeignet eine effiziente Bildung von eK zu gewährleisten.

### 4.2.2.7 Einfluss der Explantatgröße

Die Verwendung längerer Segmentschnitte sollte die Präparationszeit verkürzen und den Arbeitsaufwand während der Medienwechsel verringern, da beobachtet wurde, dass ein Großteil der geschnittenen dünnen Segmente nicht in der Lage ist embryogenen Kallus zu bilden. Die Zerlegung der Sprosse in drei bis fünf 2-3 mm lange Segmente kann eindeutig schneller durchgeführt werden und reduziert die Anzahl der Segmente die kultiviert und transferiert werden müssen, um mindestens das Dreifache. In Vorversuchen konnte oftmals das Weiterwachsen des Sprosses und der innenliegenden Blätter beobachtet werden (Melzer, 2009). Das Einschneiden der Explantate sollte somit den Kontakt des Sprossinneren mit den Medienbestandteilen gewährleisten, das Wachstum durch Zertrennen des Zellverbundes unterbrechen und die Kallusentwicklung an den zusätzlichen Schnittflächen insbesondere durch Akkumulation des longitudinal transportierten Auxins ermöglichen. Diese Anforderungen konnten mit den durchgeführten Schnitten erfüllt werden. Dennoch, die Verwendung 2-3 mm langer Segmente führte im

Vergleich zu den 0,3-0,5 mm dünnen zu weniger eK und rK pro Spross. Diese Beobachtung kann damit erklärt werden, dass der Bereich der den regenerierenden Kallus bildet sich nicht über den ganzen Spross erstreckt, sondern an einer bestimmten Stelle des Sprosses positioniert ist. Durch die Zerlegung des Sprosses in viele kleine Explantate teilte sich die kompetente Zone auf mehrere Segmente (bis zu vier) auf, was bei den größeren Explantaten auf nur max. zwei begrenzt war. Trotz dessen bildete der Kallus von den langen, eingeschnittenen Segmenten schließlich im Durchschnitt ebenso viele Regenerate pro Spross wie die Standardschnittvariante. Zwar war einer der Vorteile des entwickelten Kallusinduktionssystems über Sprosssegmente, die Gewinnung mehrerer unabhängiger ek und rK von einem verarbeiteten Spross ohne die Teilung des Kallus, jedoch scheint der Verzicht darauf - aufgrund der schneller von statten gehenden Präparation und Subkultivierung - eine gute Alternative zu sein. Die Abschätzung welche Variante im Verhältnis zum erhaltenen rK zeit- und materialsparender ist, kann jedoch im Rahmen dieser Versuche nicht festgestellt werden, da hierfür eine genaue Bedarfsabschätzung nötig wäre. Selbiges wäre für die Bewertung der verwendeten Sprosssegmente gegenüber den unreifen Embryonen in Bezug auf Effizienz der Induktion von eK und rK, den Arbeitsaufwand und den Vorteil der Unabhängigkeit von Donorpflanzen, die bei unreifen Embryonen stets im Gewächshaus verfügbar sein müssen, erforderlich. Um genaue Aussagen darüber geben zu können, welche Methode für die Hochdurchsatzanwendung geeigneter ist, ist es sinnvoll diese direkt in einem Versuchsaufbau miteinander zu vergleichen.

### **4.2.2.8 Einfluss der Keimung mit Spelze auf die Kallusinduktion**

Üblicherweise werden die Körner vor dem Auskeimen von ihrer Spelze befreit, dann gequollen und oberflächensterilisiert. Die mühsame und zeitaufwendige Prozedur der Entspelzung lässt sich nur per Hand erledigen. Um dies zu umgehen, wurde das Auskeimen der Körner mit Spelze durchgeführt und erst unmittelbar vor der Verarbeitung wurden die Sprösslinge von Korn und Spelze gelöst. Erwartungsgemäß traten mit der anfänglich verwendeten OS-Methode häufig

Kontaminationen auf, da die Spelze die Benetzung des Kornes mit dem OS-Mittel behindert. Bei der Kallusinduktion auf CIM<sub>B</sub>(11) konnte eine signifikante Verschlechterung der Bildung regenerationsfähiger Kalli nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass dies aber nicht durch die Keimung selbst hervorgerufen wird, sondern durch andere Einflüsse. Die braunen Flecken, die an manchen Sprossen zu erkennen waren könnten durch Staunässe zwischen der Hüllspelze und dem Korn entstanden sein, bzw. durch verbliebenes OS-Mittel, da der Bereich unter der Spelze für Flüssigkeiten schwerer zugänglich ist. Dieses nekrotische Verhalten einzelner Bereiche scheint sich in der Kalluskultur negativ auf die anderen Explantate ausgewirkt zu haben. Dies könnte auf die toxischen phenolischen Exsudate der nekrotischen Zellen zurückzuführen sein. Der Vorteil hingegen bei der Keimung mit Spelze ist, dass der Embryo nicht so stark durch die OS in Mitleidenschaft gezogen wird und dadurch höhere Keimraten erzielt werden können (siehe 4.2.1). Um die Nekrose zu verhindern könnte man zwei zusätzliche Waschschriffe mit ddH<sub>2</sub>O nach der OS vornehmen und die Körner auf sterilem Filterpapier von überschüssiger Flüssigkeit befreien. Zu dem sollten Sprossen mit nekrotischen Stellen zukünftig aussortiert werden, um eine Beeinträchtigung der daraus gewonnenen Explantate auszuschließen. Die Verwendung von Antioxidantien, wie Ascorbinsäure im Kalluskulturmedium wäre zusätzlich denkbar, um die Oxidation der Phenole zu unterdrücken.

#### **4.2.3 Identifizierung des embryogenen Kallus-bildenden Sprossbereiches**

Die aus den unterschiedlichen Segmenten entstandenen Kallustypen wurden bereits für verschiedene Explantate von Blättern und Sprosslingen einiger Gräser beschrieben (Vasil und Vasil, 1986) und konnten erstmals auch von Bablak und Kollegen (1995) aus reifen Körnern und Draper und Kollegen aus unreifen Embryonen von *B.distachyon* auf Kallusinduktionsmedium induziert werden. Ebenfalls wie von Bablak *et al.* (1995) und Draper *et al.* (2001) beobachtet, entwickelte sich der cremig-weiße Kallus, der in der Lage war sE zu bilden und Pflanzen zu regenerieren, nach 3-4 Wochen aus zuvor weichem, amorphem, weißlich-transparentem Kallusgewebe.

Unabhängig von der Sprosslänge sowie der Größe der verwendeten Segmente befand sich der Bereich, an dem sich der cremig-weiße, krümelige, embryogene Kallus (Typ II) entwickelte, grundsätzlich in der unteren Hälfte des Sprosses. Dennoch wurde gerade bei längeren Sprosslingen (ca. 1,5-3,9 cm) deutlich, dass sich proximal zu dem Bereich aus dem regenerierender Kallus gebildet wurde, ein Abschnitt befindet, der nicht in der Lage war embryogenen Kallus zu entwickeln und sich dieser mit zunehmender Sprosslänge ausdehnt. Hierbei handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um Segmente des Mesokotyls, das bei der Keimung im Freiland die Sprossspitze aus der Erde schiebt. Durch die Keimung der Körner im Dunkeln dehnt sich dieser also mit der Zeit weiter aus und entfernt den Sprossapex somit weiter vom Korn. Da sich jedoch auch die ersten Blätter und die Koleoptile strecken, verbleibt der Mesokotylbereich in der unteren Hälfte des Primärsprosses. Eine Abhängigkeit der Ausbeute an eK pro Spross von der Länge des Sprosses konnte in dieser Arbeit anhand des gegebenen Probenumfangs nicht festgestellt werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass sich auch der Bereich, aus dem der eK gebildet wird, ebenfalls mit zunehmendem Alter des Keimes etwas streckt. Dies müsste in weiterführenden Studien mit exakteren Segmentdicken und mehr Sprossen getestet werden.

Der mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop aufgenommene Längsschnitt des Sprosses gibt Auskunft über die Gewebestruktur und den Differenzierungsgrad der Zellen in den unterschiedlichen Bereichen des Ausgangsmaterials. Besonders gut geeignet für die Kallusentwicklung sind teilungsaktive, ungestreckte Zellen mit hohem Cytoplasmaanteil und kleinen Vakuolen, welche den Zygoten oder meristematischen Zellen sehr ähnlich sind (Fehér, 2006), bzw. meristematische Zellen selbst. Diese Voraussetzungen erfüllen das Sprossapikalmeristem, die Basis der Koeoptile oder das darunterliegende Mesokotyl, die Blattprimordien und die Blattbasen. Dies wird ebenfalls durch die Aufnahmen mit dem Licht- und Rasterelektronenmikroskop bestätigt und steht im engen Zusammenhang mit der beobachteten Entfernung der Segmente die eK bilden vom Korn in Abhängigkeit der Sprosslänge. Die Zellen der Koeoptile und die Gewebe der distalen Blattbereiche zeigen keine Veränderung bei Kultivierung auf 2,4-D-haltigem Kallusinduktionsmedium. Infolge dieser Beobachtungen kann ausgeschlossen werden, dass der untere Teil des Mesokotyls, die Koeoptile bzw. die oberen Bereiche der Blätter Ursprung der embryogenen Kalli von Sprosssegmenten sind, da sie eine zu starke Differenzierung aufweisen und somit wahrscheinlich ihre Totipotenz bereits verloren haben.

Die indirekte somatische Embryogenese aus unreifen Geweben von Spross- und Blattsegmenten wurde unter anderem schon für Sorghum (Wernicke und Brettell, 1980), Reis (Wernicke *et al.*, 1981), Weizen (Wernicke und Millkovits, 1984), Mais (Conger *et al.*, 1987; Sidorov *et al.*, 2006; Ahmadabadi *et al.*, 2007) Gerste (Becher, Halberland und Koop, 1992), Hafer (Chen *et al.*, 1995) und *Miscanthus x giganteus* (Holme und Petersen, 1996) beschrieben. Dabei wurde ebenfalls von unterschiedlichen Bereichen mit mehr oder weniger effizienter Bildung von embryogenem Kallus berichtet. Holme und Petersen (1996) zeigten anhand von *Miscanthus x giganteus*, dass der Sprossapex von den verwendeten Sprossexplantaten am meisten Kallus und zudem den größten Anteil an eK lieferte.

Betrachtet man den strukturellen Aufbau des *Brachypodium*-Sprosses in Abbildung 27 genauer, erkennt man, dass die Blattprimordien, die Blattbasis und die jungen Blätter selbst, als noch teilungsaktives und kaum differenziertes Ausgangsmaterial, für die somatische Embryogenese in Frage kommen. So konnte zum Beispiel auch die indirekte somatische Embryogenese für Sorghum, von verschiedenen Explantaten der jungen Blätter gezeigt werden (Wernicke und Brettell, 1980). Jedoch nahm die Fähigkeit der gebildeten Kalli vollständige Pflanzen zu regenerieren mit dem Alter der Gewebe bzw. ihrem Differenzierungsgrad ab. So waren die basalen Blattbereiche der jüngeren Blätter für die Kallusinduktion geeigneter als die älteren Blätter oder mehr distal gelegene Abschnitte (Wernicke *et al.*, 1981; Wernicke und Milkovits, 1984; Becher *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1995). Zudem wurde für Sorghum gezeigt, dass nur aus den sehr basalen Regionen der jüngsten Blätter embryogener Kallus gewonnen werden kann (Wernicke und Brettell, 1980). Dieser Gradient der Fähigkeit embryogenen Kallus zu bilden steht im engen Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad des Gewebes, welcher bei Gräsern von der Blattbasis zur Blattspitze zunimmt und auch im Längsschnitt des jungen *B.distachyon*-Sprosses (Abbildung 27) zu erkennen war.

Eine genauere Identifikation des Ursprungs der Zellen, die zur somatischen Embryogenese befähigt sind, kann allerdings nur durch separate Kultivierung der unterschiedlichen Gewebe erfolgen, was sich aber angesichts des geringen Maßstabes als schwierig erweisen könnte. Zudem sind eine gewisse Explantatgröße und der daraus resultierende Zellverbund für die Kallusbildung und das Überleben der Kultur erforderlich. Durch die mikroskopische Untersuchung zusätzlicher Längsschnitte von Keimen unterschiedlichen Alters könnten weitere Erkenntnisse über die Ausdehnung und Wanderung des Sprossapikalmeristems und der umliegenden unreifen Gewebe gewonnen werden. Daraus lassen sich evtl. Schlussfolgerungen für die Steigerung der Ausbeute und ein effizienteres Präparieren ableiten. So wäre es denkbar, dass sich der Sprossapex mit zunehmendem Alter der Sprösslinge weiter streckt und evtl. mehr Segmente aus diesem Bereich gewonnen werden können.



#### 4.2.4 Schlussfolgerung

Das zuvor eigens erarbeitete System zur Regeneration von Pflanzen über indirekte somatische Embryogenese aus Sprosssegmenten von *B.distachyon* konnte im Rahmen dieser Arbeit reproduziert und weiter etabliert werden.

Die Optimierung der Kallusinduktion bzw. die Interpretation der erlangten Ergebnisse gestaltet sich, resultierend aus den z.T. geringen Probenumfängen, dem Ausfall von Wiederholungen durch Kontaminationen und der Varianz innerhalb eines Versuches als schwierig. Hinzu kommt, dass der Bereich der hier verwendeten jungen Sprosse an dem eK gebildet wird, relativ klein ist und nur wenige Explantate liefert. Somit wird die Ausbeute an eK und rK pro Spross schon durch dessen Anatomie begrenzt und hängt sehr stark von der Aufteilung des Sprossapex und der umliegenden unreifen Gewebe auf die Segmente ab.

Weiterhin liefern die Ergebnisse und gemachten Beobachtungen wichtige Hinweise für zukünftige Versuche zur Optimierung und Anwendbarkeit des Regenerationssystems in Hinblick auf Präparation, Effizienz und Vergleichbarkeit.

Resultierend aus allen Versuchen wird die OS der Körner für 10 min mit 6% NaOCl empfohlen. Die Verwendung von nicht entspelzten Körnern ist denkbar, sofern das Problem des Auftretens nekrotischer Bereiche an den Keimlingen gelöst werden kann. Es ist zukünftig nicht mehr notwendig die obere Hälfte der Sprosse, sowie das Mesokotyl für die Kallusinduktion zu verarbeiten, zudem sollte die 2,4-D Konzentration während der Kallusinduktion von 22,2  $\mu\text{M}$  auf 11,1  $\mu\text{M}$  reduziert werden. Die Kultivierung der Segmente bei 28°C sollte getestet werden, da hierfür eine schnellere Kallusentwicklung zu erwarten ist und somit die Kallusinduktionsphase verkürzt werden könnte.

### **4.3 Gentransfer in Sprosssegmentkallus mittels *A.tumefaciens***

Dass embryogener Kallus (eK) aus unreifen Embryonen (uE) von *B.distachyon* mittels *A.tumefaciens* genetisch transformiert werden kann und dieser in der Lage ist wieder fertile Pflanzen zu regenerieren, wurde bereits durch einige Wissenschaftler gezeigt (Vogel, Leong und Hayden, 2006; Vain *et al.*, 2007; Vogel und Hill, 2007; Păcurar *et al.*, 2008;). In Vorversuchen konnte dies zudem exemplarisch auch für Sprosssegmentkallus gezeigt werden (Melzer, 2009). Einige der dabei entstandenen transgenen Pflanzen wurden im Rahmen dieser Arbeit molekularbiologisch analysiert (siehe Abschnitt 3.4). Bei den hier verglichenen Protokollen handelte es sich um Variationen bereits etablierter Transformationsmethoden für unreife Gersten-, *Brachypodium*- und Maisembryonen (Vogel und Hill, 2007; Păcurar *et al.*, 2008; Hensel *et al.*, 2009). Der Vorteil der ausgewählten Transformationsmethoden von Gerste und Mais liegt darin, dass sie in der Arbeitsgruppe (PRB, IPK Gatersleben) entwickelt wurden und somit leicht durchgeführt werden konnten. Zudem konnten damit hohe Transformationseffizienzen für Gerste (20-86%) und Mais (0,5-24%) erreicht werden (Hensel *et al.*, 2009). Der Vergleich der Varianten sollte zeigen, welche für die Verwendung von Kallus aus Sprosssegmenten als Ziel für den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer am geeignetsten ist und später als Grundlage für weitere Optimierung dienen könnte.

#### **4.3.1 Vergleich der Transformationsvarianten**

Die für Gerstenembryonen erprobte Methode scheint für Sprosssegmentkallus von *B.distachyon* ungeeignet zu sein. Zwar konnte ein Kallus von 94 verarbeiteten Sprossen transformiert und auch regeneriert werden, dies ist aber im Hinblick auf die für die Linie Bd21-3 veröffentlichte durchschnittliche Transformationsrate von 36,5% bei Verwendung von eK aus uE keine Grundlage für ein nutzbares System (Vogel und Hill, 2007).

Die Gründe für dieses schlechte Ergebnis können unterschiedlich sein. Angefangen bei der Komposition des Inokulations- und Co-Kulturmediums und der

Vorkulturdauer bis hin zu der Agrobakteriendichte, Behandlungsdauer und dem Selektionsbeginn. Da die Kalli auf Selektionsmedium nicht, wie in den Varianten 2 und 3, verbräunten und keinerlei Wachstum mehr zeigten, wird vermutet, dass sie bereits vor dem Kontakt mit Hygromycin abgestorben waren und nicht erst durch die Selektion. Denkbar ist, dass der Kallus die flüssige Co-Kultur nicht tolerierte, was auch schon für uE von Weizen und Triticale beobachtet werden konnte (Hensel *et al.*, 2009). Hinzu kommt die Belastung durch immer wiederkehrende Agrobakterien, die den Kallus überwuchsen, was auch bei allen anderen Varianten mehr oder weniger häufig auftrat und somit einen statistischen Vergleich der Transformationsraten unmöglich machte.

Mit Variante 2a konnten trotz festem Co-Kulturmedium keine transgenen Kalli erzeugt werden. Die Kalli wurden lediglich grau-braun und zeigten keinerlei Wachstum. Dieses Phänomen konnte bis auf wenige Ausnahmen ebenfalls bei Variante 2b beobachtet werden und wurde auch schon für den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer von *Brachypodium*-Kalluskulturen beschrieben (Vogel und Hill, 2007). Die hier verwendeten Kalli wurden nur drei Wochen vorkulti- viert. Einerseits wird vermutet, dass aktiv teilende Zellen für die Agrobakterien leichter zugänglich sind (Kartzke, Saedler und Meyer, 1990; Villemont *et al.*, 1997), andererseits könnte die starke Infektion der Zellen vermehrt hypersensitive Reaktionen hervorgerufen haben. Da der Kallus zu diesem Zeitpunkt noch ein sehr geringes Volumen besitzt, ist es sehr wahrscheinlich, dass der sogenannte *oxidative burst* durch Bildung von großen Mengen reaktiver Sauerstoffspezies den gesamten Zellverbund vergiftet (Wojtaszek, 1997). Nekrosen und der programmierte Zelltod sind häufig beobachtete Reaktionen in Zellkulturen, die nach der Inokulation und Co-Kultur mit Agrobakterien auftreten können und maßgeblich die Produktion monokotyler, transgener Pflanzen behindern (de la Riva *et al.*, 1998; Hansen, 2000). Die hypersensitive Reaktion der Zellen ist ein Schutz- mechanismus der Pflanze vor Pathogenen, bei dem infizierte Zellen geopfert werden um die Ausbreitung der Pathogene zu verhindern (de la Riva *et al.*, 1998;

Hansen, 2000). Das Auftreten von Nekrosen in Zuckerrohrkallus nach der Co-Kultur mit *A.tumefaciens* konnte von Enríquez-Obregón und Kollegen (1997) durch Zugabe verschiedener Substanzen (Ascorbinsäure, Cystein und Silbernitrat) mit antioxidativer Aktivität reduziert werden und sollte in zukünftigen Versuchen auch für *B.distachyon* getestet werden.

Die Reduktion der Agrobakteriendichte könnte die Verbesserung der Transformation und Steigerung der Überlebensrate der Kalli in Variante 2c bewirkt haben. Zum Einen wurden die Kalli seltener überwachsen und zum anderen konnten mehr Kalli mit GFP-Expression erhalten werden. Außerdem wurde 4–5 Wochen alter Kallus für die Inokulation verwendet, was sich zusätzlich positiv auf das Transformationsergebnis ausgewirkt haben könnte, da weniger Kalli bereits nach der Co-Kultur abgestorben waren und es zur Selektion transformierter Zellen durch Hygromycin kommen konnte. Im Laufe der Kultivierung nahmen dennoch die GFP-exprimierenden Zellen ab oder zeigten kein weiteres Wachstum, was zum einen den persistierenden Agrobakterien und zum anderen hypersensitiver Reaktionen geschuldet sein könnte. Zudem waren nicht alle Ausgangsexplantate kompetent proliferierenden, krümeligen, embryogenen Kallus zu bilden. Letzteres kommt daher, dass sämtliche Segmente mit einem Kallus größer als 2 mm für die Inokulation verwendet wurden und zu diesem Zeitpunkt noch nicht ersichtlich war, ob es sich um Explantate handelte, die später in der Lage waren embryogene Strukturen zu entwickeln und Pflanzen zu regenerieren (siehe Abschnitt 4.2.3 ). Am Ende des Versuches konnten mit dieser Methode auch nur zwei regenerierende Kalli erhalten werden, was hauptsächlich persistierenden Agrobakterien zuzuschreiben ist, die die Kulturen immer wieder überwuchsen. Nichts desto trotz scheint die Reduktion der Agrobakteriendichte für die Inokulation und die Verwendung älterer, größerer Kalli eine Reduktion der hypersensitiven Reaktionen bewirkt zu haben. Einer der beiden überlebenden Kalli war zudem in der Lage über 40 Pflanzen zu regenerieren, von denen alle 25 getesteten GFP in den Blättern exprimierten, was vor allem von einer prinzipiell effizienten Selektion

und der guten Regenerationsfähigkeit des Sprosssegmentkallus nach der Transformationsprozedur zeugt, wenn keine Kontaminationen vorliegen.

Die meisten unabhängigen regenerierenden Kalli pro Spross mit GFP-Expression ( $\emptyset 0,14$ ) konnten mit der modifizierten Maistransformationsmethode (Variante 3) gewonnen werden. Die Kalli wurden nach der Co-Kultur eine Woche auf hygromycinfreiem Kallusinduktionsmedium kultiviert und waren somit nicht sofort dem Hygromycin ausgesetzt. Übereinstimmend mit den Beobachtungen von Vogel und Hill (2007) setzte nach zwei Wochen auf hygromycinhaltigem Medium ein starkes Verbräunen untransformierter Bereiche ein, was von einer funktionierenden Selektion zeugt. Kleine gesunde Bereiche proliferierten nach weiterer Kultur und konnten später embryogene Strukturen ausdifferenzieren. In fast allen Fällen wiesen die sich weiterentwickelnden Sektionen GFP-Expression auf, aber auch umliegendes Gewebe ohne Markergenexpression konnte teilweise proliferieren und blieb vital. Dies könnte an der Entgiftung des Mediums durch die benachbarten transgenen Zellen liegen und wurde auch von Vogel und Hill (2007) beschrieben, weshalb die Selektion bis in die Regenerationsphase hinein beibehalten wurde. Dennoch ist ein molekularbiologischer Nachweis der erfolgreichen Integration der T-DNA in den Regeneraten notwendig, um nichttransgene Regenerate ausschließen zu können. Außerdem muss noch geklärt werden, wie viele unabhängig transgene Regenerate pro Kallus bzw. Spross gewonnen werden konnten, um die Effizienz des Regenerations- und Transformationssystems abschätzen zu können.

Die Ursachen, für das deutlich bessere Ergebnis der „Maismethode“ gegenüber den anderen getesteten Varianten, können vielfältig sein, da sich die Zusammensetzung der Co-Kulturmedien stark unterscheidet, aber auch die Vorkulturdauer, die verwendete Agrobakteriendichte und die Inokulationsdauer variiert wurden. Die in allen Versuchen immer wieder, mehr oder weniger stark die Kalli überwachsenden Agrobakterien machen zudem eine eindeutige Aussage unmöglich und führten auch innerhalb der Wiederholungen dieser Transformationsvariante zu

großen Schwankungen. So konnten in einigen Wiederholungen keine, in der besten allerdings im Mittel 0,55 rK pro Spross mit GFP-Expression erhalten werden. Demnach muss in zukünftigen Versuchen dieses Problem als erstes, durch geringere Bakterienkonzentrationen während der Inokulation und effizientere Entfernung der Bakterien nach der Co-Kultur, eliminiert werden.

Darauf aufbauend können zusätzliche Experimente durchgeführt werden, bei denen durch schrittweise Veränderung einzelner Parameter die Wirkung auf die Transformationseffizienz nachvollzogen werden kann. Es bedarf weiter Optimierung des Systems, um die von Vogel und Hill erzielten 36,5% Transformations-effizienz pro eingesetzten embryogenen Kallus für Bd21-3 zu erreichen. Allerdings sollte beachtet werden, dass ein direkter Vergleich der Effizienzen bedingt durch die unterschiedlich gewählten Explantate und Bezugssysteme (hier regenerierenden Kallus mit GFP-Expression pro verarbeiteten Spross) nicht möglich ist und dies demnach nur als Anhaltspunkt dient. Um eine bessere Vergleichbarkeit herzustellen, müsste zuvor die Anzahl an embryogenen Kalli bestimmt werden, die für die Transformation verwendet wird, da sich darauf alle bestehenden Transformationsprotokolle für Bd21-3 beziehen (Vogel, Leong und Hayden, 2006; Vogel und Hill, 2007; Păcurar *et al.*, 2008). Nachteil dabei ist jedoch, dass die Transformation so früh wie möglich durchgeführt werden sollte und somit die Bestimmung der embryogenen Kalli noch nicht möglich war und auch im Gegensatz zu den Embryonen, wie unter 4.2.3 gezeigt, auch nicht für jedes Explantat zu erwarten ist. Allerdings können die in diesem Teil der Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zukünftig helfen, lediglich die kompetenten Segmente zu präparieren und damit eine Vergleichbarkeit herzustellen. Eine weitere Alternative dazu wäre die parallele Anfertigung einer Vergleichskultur, die lediglich der Bestimmung der durchschnittlich in dem Versuch zu erwartenden Anzahl an embryogenen, bzw. regenerierenden Kalli dient und als Berechnungsgrundlage für die Transformationseffizienz herangezogen wird.

Weiterhin sollte zukünftig vermieden werden den Kallus nach der Transformation

über einen zu langen Zeitraum auf Kallusinduktionsmedium mit hohen 2,4-D Konzentrationen zu kultivieren, da sich dadurch seine Regenerationsfähigkeit vermindern kann. Zusätzlich können durch zu lange Kulturdauer auf phytohormonhaltigem Medium verstärkt unerwünschte somaklonale Variationen auftreten (Larkin und Scowcroft, 1981; von Arnold, 2008).

### 4.3.2 Schlussfolgerung

Von den hier getesteten Varianten konnten mit der Adaption des Maisprotokolls für die Transformation von *B.distachyon*-Sprosssegmenten die meisten pflanzenregenerierenden Kalli mit GFP-Expression gewonnen werden. Die Analyse der Regenerate auf die Integration der T-DNA konnte allerdings aus Zeitgründen nicht mehr erfolgen. Ein großes Problem bei allen Varianten stellte bis zuletzt die Belastung durch persistierende Agrobakterien und die langsame Entwicklung der Kalli nach der Transformation dar. Somit würden erste Ansatzpunkte für die weitere Verbesserung der Methode die Verwendung zusätzlicher Antibiotika wie Cefotaxime und gründlicheres Spülen nach der Transformation und Co-Kultur sein, sowie die Ergänzung des Selektionsmediums durch Nekrose und Apoptose reduzierende Komponenten wie DTT und L-Cystein, welche schon in dem Co-Kulturmedium von Mais enthalten waren (Hensel *et al.*, 2009). Weitere Experimente mit unterschiedlichen Vorkulturdauern und optimierter Kallusinduktion sind denkbar und könnten ebenfalls die Transformationseffizienz und die Überlebensrate an regenerationsfähigen Kalli steigern. Des Weiteren empfiehlt sich ausschließlich die Verwendung von Explantaten, die zur somatischen Embryogenese befähigt sind, um zukünftig eine Vergleichbarkeit mit anderen veröffentlichten Transformationseffizienzen für Bd21-3 zu gewährleisten und den Arbeits- und Materialaufwand zu reduzieren.

#### 4.4 Molekularbiologische Nachweise

Die molekularbiologischen Nachweise wurden anhand der Nachkommen ( $T_1$ ) bereits vorhandener transgener Linien ( $T_0$ ) durchgeführt. Letztere wurden im Rahmen einer Praktikumsarbeit erzeugt und sollten nun auf das Vorhandensein der Transgene *HPT*, *sgfp* und *gus* in jeweils 15 ihrer Nachkommen und deren Segregation untersucht werden (Melzer, 2009).

##### 4.4.1 Transgenität der $T_0$ -Generationen und generative Vererbung von Transformationsereignissen

Die Analyse der Nachkommen auf ihre Transgenität erfolgte mittels Hygromycin-Blatt-Test, GUS-Assay, PCR mit anschließender Gelelektrophorese und einem DNA-Gel-Blot-Experiment.

Der Hygromycin-Blatt-Test zeigte eindeutige Resistenzen der Blattsegmente, bei denen auch durch PCR mit anschließender Gelelektrophorese der Nachweis erbracht wurde, dass die *HPT*-Sequenz in der aus Blattproben isolierten DNA vorhanden ist. Dies beweist, dass das gesuchte Gen in den Pflanzenzellen vorhanden ist, durch Transkription und anschließende Translation das Enzym Hygromycinphosphotransferase gebildet wird und auch funktionell im Blattgewebe aktiv ist.

Mit dem GUS-Assay konnte kein Nachweis für das Vorkommen von  $\beta$ -Glucuronidase in den Blättern und Wurzelspitzen erbracht werden. Da das *gus*-Reportergen beim verwendeten Binärvektor auf einer separaten T-DNA liegt, kann es zwar unabhängig von *HPT* und *sgfp* in die Pflanzenzelle eingeschleust werden, was jedoch nicht zwangsläufig der Fall ist und diese Ereignisse nicht direkt durch die verwendeten Selektionsbedingungen in Pflanzen umgesetzt werden können. In den ausgewählten Linien war offensichtlich keine Integration beider T-DNAs erfolgt.

Durch den Southern-Blot konnte die stabile Integration der T-DNA mit *HPT* und *sgfp* in das Pflanzengenom der  $T_0$  und dessen Vererbung anhand der Analyse der



T<sub>1</sub> gezeigt werden. Die verwendete *sgfp*-DIG-Hybridisierungssonde bindet dabei nur in den unterschiedlich großen Fragmenten der genomischen DNA, wo die T-DNA integriert wurde und führt dann nach Anbinden des Antikörpers zu einem Signal auf dem Chemilumineszenzfilm in Form einer schwarzen Bande. Je nachdem an wie vielen verschiedenen Stellen die T-DNAs integriert wurden, entstehen mehrere Banden meist unterschiedlicher Größe. Diese Banden stehen demnach für die Insertion der T-DNAs an verschiedenen Stellen im Genom. Liegen diese auf dem Chromosom eng beieinander und werden dadurch zusammen vererbt, spricht man von einem Insertionsort.

In den Nachkommen der Linie 1 und 13 traten die Doppelbanden in allen Fällen grundsätzlich gemeinsam auf, weshalb von einer gekoppelten Vererbung der Transgenkopien ausgegangen werden kann. Das bedeutet, dass zwei Kopien der T-DNA auf dem gleichen Chromosom in unmittelbarer Nähe zueinander integriert wurden, also nur ein Integrationsort vorliegt.

Die Banden der neun transgenen Nachkommen von Linie 1 mit einer Größe von ca. 5,5 kb entsprechen ungefähr der Länge der T-DNA, die mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit durch Tandem-Integration aus mindestens zwei Kopien entstanden ist. Die größere Bande besteht in diesem Fall aus einem Teil der T-DNA und einem Abschnitt der davor liegenden genomischen DNA. Aufgrund der Stärke der unteren Bande lässt sich vermuten, dass es sich hier um mehr als nur zwei integrierte T-DNAs handeln könnte. Die Verwendung eines alternativen in der T-DNA schneidenden Enzyms bei der Restriktionsverdau der genomischen DNA könnte darüber Aufschluss geben, ob es sich tatsächlich um unmittelbar hintereinanderliegende T-DNAs handelt oder dieses Fragment nur zufällig dessen Größe besitzt. Die 11 Nachkommen der Linie 13 sind hingegen eindeutig Doppelkopie-Pflanzen mit einem Integrationsort die 2,75:1, also entsprechend Mendel (3:1) segregieren.

Nur zwei von 15 Tochterpflanzen der Linie 5 enthielten die gesuchte *sgfp*-Sequenz, womit keine Segregation nach Mendel vorliegt. Der Grund für diese

Erscheinung ist eine chimäre primärtransgene Pflanze, die zu einem Teil aus transgenen Zellen und zum anderen aus nichttransgenem Gewebe bestand, wobei und beide Sektionen an der Fortpflanzung beteiligt waren (Dong *et al.*, 1993). Die Entstehung von transgenen Chimären wurde ebenfalls für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von Haferblattexplantaten beschrieben und kann auftreten, wenn das Regenerat, nicht wie bei der somatischen Embryogenese aus nur einer Zelle entstammt sondern organogenetischen Ursprungs ist (Gasparis *et al.*, 2008) oder das Transformationsereignis nur einen Teil eines somatischen Embryos betrifft. Die Ursache für das Überleben nichttransgener Bereiche kann eine ineffiziente Selektion bzw. die Entgiftung des Mediums durch die umliegenden transformierten Zellen sein (Kumlehn und Hensel, 2009).

Zwei Nachkommen der Linie 2 besaßen das gleiche Integrationsmuster der T-DNA, wie die neun transgenen Nachkommen der Linie 1. Die anderen neun transgenen Pflanzen besaßen nur eine Kopie, die sich an einem anderen Integrationsort befand. Somit wurde nachgewiesen, dass die primärtransgenen Pflanzen der Linie 1 und 2 keine Klone, aber auch nicht vollständig unabhängig sind. Beide wurden aus dem selben Kallus regeneriert und es ist sehr wahrscheinlich, dass die T<sub>0</sub> der Linie 2 aus einem Zellverbund gebildet wurde, welcher zum Teil aus Zellen des Transformationsereignisses bestand, aus dem auch die Primärtransgene der Linie 1 entsprungen ist. Der andere Teil hingegen scheint aus einem weiteren, unabhängigen Transformationsereignis hervorgegangen zu sein.

Damit zukünftig die Regeneration über Organogenese ausgeschlossen werden kann, müssten die somatischen Embryonen von umgebendem Kallusgewebe befreit und separat auf dem Regenerationsmedium kultiviert werden. Um zu verhindern, dass chimäre Pflanzen aus einem bereits bestehenden Proembryo gebildet werden, von dem nur einzelne Zellen transformiert werden, muss der Gentransfer durch die Agrobakterien vor der Differenzierung proembryogener Massen erfolgen. Die Bildung der somatischen Embryonen aus einem multizellulären Ursprung kann hingegen nicht verhindert werden. Diese Maßnahmen werden jedoch

nicht als erforderlich angesehen, da generative Nachkommen primärtransgener Pflanzen individuell ohnehin genetisch homogen sind und damit das Problem der Chimärenbildung keine langfristigen Konsequenzen mit sich bringt.

### 4.4.2 Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann man sagen, dass durch den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer von Kallus aus Sprosssegmenten der Inzuchtlinie Linie Bd21-3 fertile primärtransgene Pflanzen erzeugt werden können. Die getesteten Linien zeichnen sich durch einfache Integrationsmuster der T-DNA aus, die hauptsächlich in geringen Kopiezahlen und an einem Integrationsort des Genoms vorliegen. Dies ist für den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer typisch und erwünscht, da zu mehrere Transgen-Kopien unter anderem zu *Genesilencing* führen können (Meyer, 1995; Vogel und Hill, 2007). Zudem ist im Fall von Einzelkopie-Linien aufgrund der Mendel'schen Segregation bereits jede Vierte der ersten Nachkommen bezüglich des Transgens homozygot.

Weiterhin konnte die Entstehung von chimären Regeneraten beobachtet werden. Dieser eher ungewünschte Effekt resultiert in einer ungewöhnlichen Segregation, ähnlich derer ungekoppelter Insertionen (Kumlehn und Hensel, 2009) und wird daher ohne Southern-Blot-Analyse üblicherweise nicht erkannt. Allerdings verliert sich die chimäre Eigenschaft in der ersten generativen Nachkommenschaft, da diese Pflanzen ihren Ursprung in jeweils nur einer Zelle (Zygote) haben, die allenfalls homozygot, hemizygot oder azygot bezüglich des Transgens, jedoch niemals chimär sein kann.

Zusätzlich konnte an den Linien 1 und 2 gezeigt werden, dass es theoretisch möglich ist, aus einem Kallus Primärtransgene mit verschiedenen Integrationsmustern zu regenerieren. Es sollte aber bevorzugt auf Pflänzchen zurückgegriffen werden, die von ein und demselben Kallus nicht in unmittelbarer Nähe gebildet wurden, um eine Chimärenbildung aus mehreren unabhängigen Transformationsereignissen zu vermeiden.

## 5 Zusammenfassung

Die Etablierung eines effizienten Transformations- und Regenerationssystems ist für Modellpflanzen von grundlegender Bedeutung und konnte für *B.distachyon*, als nahe Verwandte der *Triticeae*, unter Verwendung von embryogenen Kalluskulturen aus unreifen Embryonen bereits durch andere Forschungsgruppen erreicht werden (Bablak *et al.*, 1995; Draper *et al.*, 2001; Christiansen *et al.*, 2005; Vogel, Leong und Hayden, 2006; Păcurar *et al.*, 2008; Vogel und Hill, 2007). Der Nachteil der dazu verwendeten Explantate liegt in der Bereitstellung des Donormaterials. So müssen die Pflanzen fast über einen ganzen Generationszyklus angezogen und verfügbar gehalten werden und sich zum Zeitpunkt der Materialentnahme im richtigen Stadium befinden. Dabei variiert zudem die Größe der Embryonen innerhalb der Ährchen, die von entscheidender Bedeutung für die Effizienz der Kallusentwicklung ist. Dies hat einen hohen Ressourcenaufwand zur Folge. Zudem ist die Präparation der Embryonen im geeigneten Stadium aufgrund ihrer geringen Größe außerordentlich schwierig. Durch Verwendung von jungen Sprosssegmenten für die Induktion von embryogenem Kallus sollten diese Probleme umgangen werden und die Etablierung einer neuen Methode für die Regeneration und Transformation der neuen Modellpflanze *B.distachyon* erfolgen. Die Verwendung von Spross- und Blattsegmenten junger Sprösslinge für die multiple Pflanzenregeneration wurde bereits für andere Gräserarten wie Sorghum (Wernicke *et al.*, 1980), Reis (Wernicke *et al.*, 1981), Weizen (Wernicke *et al.*, 1984), Mais (Conger *et al.*, 1987; Sidorov *et al.*, 2006; Ahmadabadi *et al.*, 2007), Gerste (Becher *et al.*, 1992), Hafer (Chen *et al.*, 1995) und *Miscanthus x giganteus* (Holme *et al.*, 1996) etabliert.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bildung von embryogenem Kallus vom Typ II aus 0,3-0,5 mm dünnen Sprosssegmenten reproduzierbar ist und aus den gebildeten somatischen Embryonen vollständige Pflanzen regenerieren können. Die Standardvariante mit 11,1 µM 2,4-D im Kallusinduktionsmedium (CIM<sub>B</sub>) brachte eine Gesamteffizienz von durchschnittlich 8,3

Regenraten pro Spross. Durch fortgesetzte Kultur der Kalli auf Medium mit 11,1  $\mu\text{M}$  2,4-D-Konzentration - nach vorangegangenen vier Wochen Kallusinduktion (KI) mit 22,2  $\mu\text{M}$  2,4-D - konnte die höchste Gesamteffizienz aller getesteten Varianten mit 13,7 Regenraten pro Spross erreicht werden. Die Verwendung größerer, eingeschnittener Explantate und die Keimung der Körner mit Spelze reduzierten im Durchschnitt die Ausbeute auf weniger als einen regenerierenden Kallus pro Spross, ermöglichten jedoch ein schnelleres Präparieren und senkten damit den Arbeitsaufwand erheblich.

Die Untersuchung der verschiedenen Sprossabschnitte zeigte, dass der für die somatische Embryogenese befähigte Bereich sich mit zunehmender Länge des Sprosslings weiter von dessen Ursprung entfernte, aber immer in der unteren Hälfte des Sprosses blieb. Die mikroskopischen Untersuchungen weisen darauf hin, dass der regenerierende Kallus aus dem Sprossapex, welcher das apikale Sprossmeristem und die Blattprimordien umfasst, gebildet wird. Die Kompetenz der unteren Bereiche junger Blätter und der Blattbasis zur Bildung von embryogenem Kallus ist ebenfalls denkbar. Die Koeptile, ältere Blätter und der sich unmittelbar am Korn befindliche Bereich des Mesokotyls konnten als Quelle embryogener Kalli ausgeschlossen werden.

Für den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer in Kalli aus Sprosssegmenten konnte keine aussagekräftige Effizienz ermittelt werden, da durch persistierende Agrobakterien in allen Varianten ein hoher Verlust an Explantaten auftrat. Das beste Ergebnis konnte jedoch durch Adaption des Maistransformationsprotokolls erreicht werden, mit dem insgesamt aus 291 verarbeiteten Sprossen 42 unabhängige Kalli mit GFP-Expression gewonnen werden konnte, die unter Selektionsdruck in der Lage waren Pflänzchen zu regenerieren. Es wurden insgesamt 205 Regenrate in Erde überführt. Deren Analyse auf Integration der T-DNA und Unabhängigkeit der Regenrate aus einem Kallus konnte allerdings im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der limitierten Zeitspanne nicht mehr erfolgen.

Der Nachweis für die stabile Integration der T-DNA durch den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer in *B.distachyon*-Sprosssegmentkallus und deren generative Vererbung konnte jedoch anhand der T<sub>1</sub>-Generation von vier primärtransgenen, aus Vorversuchen stammenden Pflanzen geführt werden. Es wurde gezeigt, dass es sich um „*low-copy*“-Insertionen mit einem Integrationsort handelte von denen zwei nach den Mendel'schen Gesetzen segregierten und zwei chimären Ursprungs waren.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit sollte ein Binärplasmid für den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer erstellt werden, welches zukünftig die Identifikation transformierter Gewebe über den Nachweis zweier unterschiedlicher Reportergene ermöglicht. Der erste Schritt, die Erstellung des Zwischenvektors pBM152, verlief erfolgreich und es konnte eine transiente Expression des Fusionsproteins *egfp:gus* - reguliert durch den *UBI-1*-Promotor und einen 35S-Terminator - in Gerstenembryonen über den histochemischen GUS-Assay und Anregung des Proteins mit UV-Licht nachgewiesen werden. Die Integration dieser Expressionskassette in das Binärplasmid p6int-Ubi, welches *hpt* als Resistenzgen unter der Kontrolle des *UBI-1*-Promotors und des 35S-Terminators enthält, konnte hingegen nicht erfolgreich beendet werden.



## Anhang

### Medien und Lösungen

Alle Medien und Lösungen wurde, sofern nicht anders angegeben, mit doppelt destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) angefertigt.

#### Medien für die Klonierungsarbeiten

Die Bakterienmedien wurden autoklaviert. Hitzeinstabile Komponenten wurden sterilfiltriert (stf.) und nach den autoklavieren zugegeben. Die Zugabe von Antibiotika (stf.) erfolgte nach dem Abkühlen der Medien je nach Selektionsresistenzgen der verwendeten Plasmide (2.1.4).

**Tabelle 10: LB-Flüssigmedium**

<i>LB Broth</i>	
<i>LB Broth High Salt</i>	25 g/l
pH	7,2

**Tabelle 11: LB-Festmedium**

<i>LB Agar</i>	
<i>LB Agar High Salt</i>	35 g/l
pH	7,2

**Tabelle 12: *super optimal broth with catabolic repressor (SOC)*-Medium**

<i>SOC-Medium</i>	
Hefeextrakt	5,0 g/l
Trypton	20,0 g/l
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10,0 mM
MgSO <sub>4</sub>	10,0 mM
pH	9,5
Glucose stf (nach dem Autoklavieren).	20,0 mM



**Medien für Pflanzengewebekultur**

Die Keimung der reifen *B.distachyon* Körner für die Gewebekultur erfolgte auf Keimmedium (KM). Die Sprossexplantate wurden für die Kallusinduktion auf CIM<sub>B</sub>, mit entsprechend in Klammern angegebener 2,4-D Konzentration in µM, kultiviert. Zusätzlich wurden je nach Versuch 3 mM Glutamin, 3,75 mM CuSO<sub>4</sub>, 0,3–3 µM 6-BAP hinzugefügt oder MS-Salze mit 20,6 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (M 0221) bzw. 30 g/l Saccharose statt 30 g/l Maltose verwendet. Die Regenerationsphase erfolgte auf K4N-Medium (RM). Alle Pflanzenkulturmedien (4fach konzentriert) wurden steril filtriert (stf.) (0,22 µm), die Phytagellösung (1,3fach konzentriert) separat autoklaviert und erst unmittelbar vor dem Gießen der Platten beigemischt. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit 1 N HCl oder 1 N KOH. Tabelle 14 ist am Beispiel des Standards CIM<sub>B</sub>(11) angegeben.

**Tabelle 13: Keimmedium**

KM	
Gelrite	8,0 g/l
CaCl <sub>2</sub>	5,0 mM

**Tabelle 14: CIM<sub>B</sub>(11)-Kallusinduktionsmedium**

CIM <sub>B</sub> (11)	
MS-Salze modifiziert Nu.4: NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> frei (M 0238)	4,3 g/l
Maltose	30,0 g/l
Gamborg B5-Vitamine (1000x)	1,0 ml/l
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)	11,1 µM
pH	5,8
Phytigel	3,0 g/l

**Tabelle 15: K4N-Regenerationsmedium (Kumlehn *et al.*, 2006)**

RM	
K4-Makro Minerale (20x)	50,0 ml/l
K4-Mikro Minerale (1000x)	1,0 ml/l
Maltose	100 mM
Gamborg B5-Vitamine (1000x)	1,0 ml/l
Glutamin	1,0 mM
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	4,9 µM
NaFe Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	75,0 µM
pH	5,8
Phytigel	3,0 g/l

**Tabelle 16: K4- Makro und Mikro Minerale (Kumlehn *et al.*, 2006)**

K4- Makro Minerale (20x) für 1 l [g]	
CaCl <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,82
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,8
KNO <sub>3</sub>	40,4
MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,92
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,6
K4- Mikro Minerale (1000x) für 100 ml [mg]	
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2,4
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	2,5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	310,0
KJ	17,0
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	840,0
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	12,0
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	720,0

**Medien für den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer**

Die Medien für die Kalluskulturen wurden, wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, hergestellt. Die Bakterienmedien wurden autoklaviert und nach Abkühlung auf ca. 50-60°C die Antibiotika zugegeben.

**Tabelle 17: MG/L Bakterienmedium (Garfinkel und Nester, 1980)**

MG/L	
Mannitol	5,0 g/l
Hefeextrakt	2,5 g/l
Trypton	5,0 g/l
L-Glutaminsäure	1,0 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250,0 mg/l
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	100,0 mg/l
NaCl	100,0 mg/l
pH	7,0
Biotin (nach dem Autoklavieren stf.)	1,0 µg/l
Mikroagar (für Festmedium)	12,0 g/l

**Tabelle 18: CIM<sub>B</sub>(11)-Co-Kulturmedium**

CIM <sub>B</sub> (11)-Co	
CIM <sub>B</sub> (11)-Kallusinduktionsmedium	Siehe Tabelle 14
pH	5,8
Acetosyringon (nach dem Autoklavieren stf.)	0,5 mM

**Tabelle 19: CIM<sub>B</sub>(11)-Selektionsmedium**

CIM <sub>B</sub> (11)-Sel	
CIM <sub>B</sub> (11)-Kallusinduktionsmedium	Siehe Tabelle 14
pH	5,8
Hygromycin B stf.	25 bzw. 50 mg/l
Timentin stf.	225 bzw. 300 mg/l

**Tabelle 20: Gersten-Inokulationsmedium (Hensel *et al.*, 2009)**

CIM <sub>G</sub>	
MS Salze (M 0221)	4,30 g/l
Maltose (Duchefa)	30,00 g/l
Casein-Hydrolysat	1,00 g/l
Dicamba	2,50 mg/l
L-Prolin	0,69 g/l
Myo-Innositol	0,25 g/l
Thiamine-HCl	1,00 mg/l
pH	5,8
Cystein (nach dem Autoklavieren stf.)	0,80 g/l
Acetosyringon (nach dem Autoklavieren stf.)	0,5 mM

**Tabelle 21: Mais-Infektionslösung (Hensel *et al.*, 2009)**

IL <sub>M</sub>	
Chu (N6)-Salze	4,00 g/l
Chu (N6)-Vitamine (1000x)	1,00 ml/l
Glucose	36,00 g/l
Saccharose	68,40 g/l
2,4-D	6,75 µM
L-Prolin	0,70 g/l
pH	5,2
Acetosyringon (nach dem Autoklavieren stf.)	0,50 mM

**Tabelle 22: Mais-Co-Kulturmedium (Hensel *et al.*, 2009)**

CCM <sub>M</sub>	
Chu (N6)-Salze	2,0 g/l
Saccharose	34,2 g/l
B5 Vitamine (1000x)	1,0 ml/l
2-(N-Morpholino)Ethansulfonsäure (MES)	0,5 g/l
CaCl <sub>2</sub>	2,0 µM
Dicamba	20,0 µM

L-Prolin	2,9 g/l
pH	5,8
Acetosyringon (nach dem Autoklavieren stf.)	0,5 mM
Cystein (nach dem Autoklavieren stf.)	0,4 g/l
Dithiolthreitol (DDT) (nach dem Autoklavieren stf.)	1,0 $\mu$ M

**Tabelle 23: K4N-Regenerationsmedium mit Selektion**

RM-Sel	
K <sub>4</sub> N-Regenerationsmedium	
Hygromycin B	25 mg/l
Timentin stf.	150 mg/l

**Lösungen für molekularbiologische Arbeiten**

Das MS-Flüssigmedium wurde autoklaviert, ebenso wie der Laurylpuffer und der TE-Puffer (ohne RNase). Die Lösungen wurden mit ddH<sub>2</sub>O angesetzt.

**Tabelle 24: MS-Flüssigmedium für HYG-Blatttest**

MS-Flüssigmedium	
MS-Salze mit MS-Vitaminen (M 0222)	4,4 g/l
Hygromycin B	0,2 g/l
pH	5,8

**Tabelle 25: X-Gluc-Lösung für GUS-Assay**

X-Gluc-Lösung	
X-Gluc	1,0 g/l
Methanol	50,0 ml/l
EDTA(Na <sub>2</sub> )	10,0 mM
K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	0,5 µM
K <sub>4</sub> (Fe(CN) <sub>6</sub> )·3H <sub>2</sub> O	0,5 µM
NaPO <sub>4</sub> (pH=7)	0,1 mM
ddH <sub>2</sub> O	420,0 ml/l
<i>15-20 min rühren</i>	

**Tabelle 26: DNA-Extraktionspuffer**

Lauryl-Puffer	
EDTA (pH 8,0) 0,5 M	20 ml/l
NaCl 4 M	25 ml/l
N-Lauryl-Sarcosin	10 g
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)-HCl (pH 8,0) 1 M	100 ml/l

**Tabelle 27: TRIS-EDTA-Puffer mit RNase**

TE-Puffer + RNase für 100 ml	
EDTA (pH 8,0) 0,5 M	2 ml
TRIS-HCl (pH 8,0) 1 M	10 ml
RNase (10 mg/ml) (nach dem Autoklavieren)	400 µl

**Tabelle 28: TRIS-Borat-EDTA-Puffer**

TBE-Puffer	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	89 mM
Na EDTA	2 mM
TRIS	89 mM

**Tabelle 29: Blaumarker**

BM	
Bromphenolblau	0,25 g
Glycerol	30,00 ml
Xylene cyanol	0,25 g
ddH <sub>2</sub> O	70,00 ml

**Tabelle 30: Denaturierungspuffer**

DNP [g/l]	
NaCl	87,7
NaOH	20,0

**Tabelle 31: Neutralisationspuffer**

NP [g/l]	
NaCl	175,4
TRIS	11,8
TRIS-HCl	63,5

**Tabelle 32: 20 x salziges Natrium Citrat**

20 x SSC [g/l]	
Na-Citrat	88,2
NaCl	63,5
pH	7,0

**Tabelle 33: Maleinsäurepuffer**

MP [g/l]	
Maleinsäure	11,6
NaCl	8,8
NaOH	7,7
pH	7,5

**Tabelle 34: Detektionspuffer**

DP [g/l]	
NaCl	5,8
NaOH	7,7
TRIS-HCl	12,1
pH	9,5

**Tabelle 35: Waschpuffer**

WP [g/l]	
NaCl	5,8
NaOH	7,7
TRIS-HCl	12,1
pH	9,5

**Tabelle 36: 20% Natriumdodecylsulfat**

20% SDS [g/l]	
Natriumdodecylsulfat	200



## Chemikalien

Tabelle 37: Chemikalienliste

Chemikalie	Hersteller
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)	Duchefa
6-Benzylaminopurine (6-BAP)	Duchefa
Acetosyringone	Fluka
Ampicillin	Duchefa
Biotin	Merck
Bromphenolblau	Sigma
CaCl <sub>2</sub>	Roth
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Sigma
Carbenicillin	Duchefa
Casein Hydrolysat	Duchefa
Chu-N6-Salze	Duchefa
Chu-N6-Vitamine	Duchefa
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	Duchefa
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	Duchefa
Cystein	Sigma
DDT	Sigma
Dicamba	Duchefa
EDTA	Roth
Ethanol (reinst/technisch)	Roth
Ethidiumbromid	Serva
Gamborg B5 Vitamine	Duchefa
Gelrite	Duchefa
Glukose	Merck
Glutamin	Sigma
Glycerol	Duchefa
GoTaq-Polymerase	Fermentas
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Roth
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Roth

<b>Hefeextrakt</b>	Serva
<b>HgCl<sub>2</sub></b>	Sigma
<b>Hygromycin B</b>	Roche
<b>Iso-Propanol</b>	Roth
<b>K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]</b>	Merck
<b>K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 3H<sub>2</sub>O</b>	Merck
<b>KCl</b>	Roth
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Sigma
<b>KJ</b>	Roth
<b>KNO<sub>3</sub></b>	Sigma
<b>LB Agar <i>High salt</i></b>	Duchefa
<b>LB Broth <i>High salt</i></b>	Duchefa
<b>L-Glutamin</b>	Duchefa
<b>L-Prolin</b>	Duchefa
<b>Maleinsäure</b>	Merck
<b>Maltose</b>	Duchefa
<b>Mannitol</b>	Duchefa
<b>MES</b>	Duchefa
<b>Methanol</b>	Roth
<b>MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O</b>	duchefa
<b>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	Sigma
<b>MnSO<sub>4</sub></b>	Sigma
<b>Mikroagar</b>	Duchefa
<b>MS-Salze (M 0221)</b>	Duchefa
<b>MS-Salze mit MS-Vitaminen (M 0222)</b>	Duchefa
<b>MS-Salze modifiziert Nu.4: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> frei (M 0238)</b>	Duchefa
<b>Myo-Inositol</b>	Duchefa
<b>Na EDTA</b>	Sigma
<b>NaFe EDTA</b>	Duchefa
<b>Na-Citrat</b>	Roth
<b>NaCl</b>	Roth

<b>NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O</b>	Duchefa
<b>NaOCL (12%)</b>	Roth
<b>NaOH</b>	Roth
<b>NaPO<sub>4</sub></b>	Serva
<b>Natriumacetat (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)</b>	Roth
<b>Natriumdodecylsulfat (SDS)</b>	Serva
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	Sigma
<b>N-Lauryl-Sarcosin</b>	Sigma
<b>PEG 4000</b>	Fermentas
<b>Phytigel</b>	Sigma
<b>Restriktionsendonukleasen (<i>AscI</i>, <i>EcoRV</i>, <i>HinDIII</i>, <i>MluI</i>, <i>SfiI</i>, <i>StuI</i>)</b>	Fermentas
<b>Rifampicin</b>	Duchefa
<b>RNase</b>	Serva
<b>Saccharose</b>	Duchefa
<b>Spectinomycin</b>	Duchefa
<b>T4-Ligase</b>	Fermentas
<b>Thiamine-HCl</b>	Duchefa
<b>Timentin</b>	Duchefa
<b>TRIS</b>	Roth
<b>TRIS-HCl</b>	Roth
<b>Trypton</b>	Duchefa
<b>Tween 20<sup>®</sup></b>	Roth
<b>X-Gluc</b>	Duchefa
<b>Xylene Cyanol</b>	Sigma
<b>ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	Duchefa

## Geräte

Tabelle 38: Geräteliste

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
<b>Autoklav</b>	Steriltechnik AG	Laboklav 10.0
<b>Brenner</b>	Schütt	Flammy S
<b>Crosslinker</b>	peqLAB	BLXE254
<b>Feinwaage</b>	Sartorius AG	BP61S
<b>Hybridisierungssofen</b>	Techne	Hybridiser HB-1D
<b>Inkubationsschrank</b>	Heraeus Instruments	B6
<b>Klimaprüfschrank</b>	Rubarth Apparate GmbH	Rumed
<b>Klimaprüfschrank</b>	Percival	Cu-36L6D
<b>Konfokales Laser Scanning Mikroskop</b>	Carl Zeiss AG	CLSM 510 META
<b>Laborwaage</b>	Kern	GJ
<b>Magnetrührer</b>	Heidolph	Hei-Standard
<b>Mastercycler</b>	Eppendorf AG	ep gradient S
<b>Membranpumpe</b>	Vacubrand	ME4R/3.6
<b>Mikroskop Kamera</b>	Carl Zeiss AG	AxioCam HRc
<b>pH-Meter</b>	WTW	pH 538
<b>Photometer</b>	Amersham Pharmacia Bio- tech	Ultraspec 3000
<b>Reinwerkbank</b>	Heraeus Instruments	Hera <i>Guard</i>
<b>Schüttelinkubator</b>	HT INFORS	Minitron
<b>Schwingmühle</b>	Retsch	MM 400
<b>Sicherheitswerkbank</b>	Heraeus Instruments	Hera save
<b>Stereomikroskop</b>	Carl Zeiss AG	Axiovert 200M

<b>Stereomikroskop</b>	Leica Mikrosystems	MZFL3
<b>Stereomikroskop</b>	Carl Zeiss AG	Stemi 2000-C
<b>Thermomixer</b>	Eppendorf AG	Thermomixer comfort
<b>Tischzentrifuge</b>	Eppendorf AG	Centrifuge 5415 R
<b>Tischzentrifuge</b>	Eppendorf AG	Centrifuge 5810 R
<b>Vortexer</b>	IKA	MS2 minishaker
<b>Vortexer</b>	IKA	Genius 3
<b>Wasserbad</b>	Grant	Sub
<b>Wippschüttler</b>	GFL	3014

## Literaturverzeichnis

- Bablak, P., Draper, J., Davey, M., & Lynch, P.** (1995). Plant regeneration and micropropagation of *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (42), S. 97-107.
- Becher, T., Halberland, G., & Koop, H.-U.** (1992). Callus formation an plant regeneration in standard and microexplants from seedlings of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Rep.* (11), S. 39-43.
- Beck, C. B.** (2010). *An Introduction to Plant Structure an Development: plant anatomy for the twenty-first century* (2. Ausg.). Cambridge, UK: Campridge University Press. ISBN 978-0-521-51805-5
- Boutilier, K., Offringa, R., Sharma, V. K., Kieft, H., Ouellet, T., Zhang, L. et al.** (2002). Ectopic Expression of *BABY BOOM* Triggers a Conversion from Vegetative to Embryonic Growth. *The Plant Cell* (14), S. 1737–1749.
- Carpita, N. C.** (1996). Structure and biogenesis of the cell wall of grasses. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* (47), S. 445-476.
- Chen, H., Xu, G., Loschke, D. C., Tomaska, L., & Rolfe, B. G.** (1995). Efficient callus formation and plant regeneration from somatic embryos of oat (*Avena sativa* L.). *Plant Cell Rep.* (14), S. 393-397.
- Cheng, M., Fry, J. E., & Pang, S.** (1997). Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology* (115), S. 971-980.
- Christiansen, P., Didion, T., Andersen, C., Folling, M., & Nielsen, K.** (2005). A rapid and efficient transformation protocol for the grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell Rep.* (23), S. 751-758.
- de la Riva, G. A., Gonzalez-Cabrera, J., Vazquez-Padron, R., & Ayra-Pardo, C.** (1998). *Agrobacterium tumefaciens*: A natural tool for plant transformation. Abgerufen am 08. 03 2011 von EJB Electronic Journal of Biotechnologie:  
<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol1/issue3/full/1/reprint.html>
- Dong, J.-Z., & McHughen, A.** (1993). Transgenic flax plants from *Agrobakterium* mediated transformation: incidence of chimeric regenerants and inheritance of transgenic plants. *Plant science* (93), S. 139-148.

- Draper, J., Mur, L., Junkins, G., Ghosh-Biswas, G., Bablak, P., Hasterok, R. et al.** (2001). *Brachypodium distachyon*: A new model system for functional genomics in grasses. *Plant Phys.* (127), S. 1539-1555.
- Endress, R.** (1994). *Plant Cell Biotechnology*. Berlin: Springer-Verlag. ISBN 3-540-56947-2
- Enríquez-Obregón, G. A., Vázquez-Padrón, R. I., Prieto-Samsónov, D. L., Pérez, M., & Selman-Housein, G.** (1997). Genetic transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidants compounds. *Biotechnología Aplicada* (14), S. 169-174.
- Fehér, A.** (2006). Why Somatic Plant Cells start to from Embryos? In A. Mujib, & J. Samaj, *Somatic Embryogenesis* (2. Ausg., S. 85-101). Berlin: Springer-Verlag. Doi 10.1007/7089\_019
- Flavell, R.** (2009). Role of Model Plant Species. In D. J. Somers, P. Langridge, & J. P. Gustafson, *Plant Genomics - Methods an Protocolls* (Bd. 513, S. 1-18). Springer-Verlag. DOI: 10.1007/978-1-59745-427-8\_1
- Genaust, H.** (1996). *Etymologisches Wörterbuch der botanischen Pflanzennamen* (3. Ausg.). Birkhäuser. ISBN 3-937872-16-7
- George, E. F.** (2008). Plant Tissue Culture Procedure - Background. In E. F. George, M. A. Hall, G.-J. de Klerk, & Springer (Hrsg.), *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition* (Bd 1, S. 1-28). Springer-Verlag. ISBN 987-1-4020-5004-6
- George, E. F., & Debergh, P. C.** (2008). Micropropagation: Uses and Methods. In E. F. George, M. A. Hall, & G.-J. de Klerk, *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition* (Bd 1, S. 29-64). Springer-Verlag. ISBN 987-1-4020-5004-6
- George, E. F., & de Klerk, G.-J.** (2008). The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Mikro-Nutrients. In E. F. George, M. A. Hall, & G.-J. de Klerk, *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition* (Bd 1, S. 65-114). Springer-Verlag. ISBN 987-1-4020-5004-6
- Gilbert, D.** (2006). *Energy-rich Portfolio of New Genome Sequencing Targets for DOE JGI*. Abgerufen am 18. 04 2011 von: [http://www.jgi.doe.gov/News/news\\_7\\_11\\_06.html](http://www.jgi.doe.gov/News/news_7_11_06.html)
- Grant, S. G. H., Jessee, J., Bloom, F., & Hanahan, D.** (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli*

- methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (87), S. 4645-4649.
- Hansen, G.** (2000). Evidence for *Agrobacterium*-Induced Apoptosis in Mais Cells. *Molecular Plant-Mikrobe Interactions* (13), S. 649-657.
- Heidmann, I., de Lange, B., Lambalk, J., Angenent, G. C., & Boutillier, K.** (2011). Efficient sweet pepper transformation mediated by *BABY BOOM* transcription factor. *Plant Cell Rep*, DOI 10.1007/s00299-011-1018-x
- Hensel, G., Karstner, C., Oleszczuk, S., Riechen, J., & Kumlehn, J.** (2009). *Agrobacterium*-Mediated Gene Transfer to Cereal Crop Plants: Current Protocols for Barley, Wheat, Triticale and Maize. *International Journal of Plant Gernomics*. DOI 10.1155/2009/835608.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., & Kumashiro, T.** (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal* (6), S. 271-282.
- Holme, I. B., & Petersen, K. K.** (1996). Callusinduktion und plant regeneration from different explant types of *Miscanthus X ogiformis* Honda 'Giganteus'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (45), S. 43-52.
- Hunault, G.** (1985). Organic acids, pH, ammoinum and nitrate interactions on the growth of *Asparagus* tissues cultivated in vitro. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.* (13), S. 63-75.
- Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T., & Kumashiro, T.** (1996). High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnologie* (14), S. 745-750.
- Kartzke, S., Saedler, H., & Meyer, P.** (1990). Molekular analysis of transgenic plants derived from transformations of protoplasts at various stages of the cell-cycle. *Plant Science* (67), S. 63-72.
- Kempken, F., Kempken, R., & Stockmeyer, K.** (2004). *Gentechnik bei Pflanzen - Chancen und Risiken* (2. Ausg.). Springer-Verlag. ISBN 3-540-01216-8
- Kielly, G. A., & Bowley, S. R.** (1992). Genetic control of somatic embryogenesis in alfalfa. *Genome* (35), S. 474-477.
- Kikkert, J. R.** (1998). Biolostic Transformation of Plant Cells. In: J.E. Cells (Hrsg.) *Cell biology: a laboratory handbook*, (4. Ausg. S.157-161). Academic Press. ISBN 978-0121647148



- Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N., & Kumashiro, T.** (1996). Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J.* (10), S. 165-174.
- Krautwig, B., & Lörz, H.** (1996). Von der Zelle zur Getreidepflanze - In-vitro-Embryogenese und Regeneration bei Poaceen. *Naturwissenschaften* (83), S. 414-423.
- Kumlehn, J., & Hensel, G.** (2009). Genetic Transformation technology in the *Triticeae*. *Breeding Science* (59), S. 553-560.
- Kumlehn, J., Serazetdinova, L., Hensel, G., Becker, D., & Lörz, H.** (2006). Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant biotechnology Journal* (4), S. 251-261.
- Larkin, P. J., & Scowcroft, W. R.** (1981). Somaclonal variation—a novel source of variability. *Theoretical and Applied Genetics* (60), S. 197-214.
- Lazo, G., Stein, P., & Ludwig, R.** (1991). A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Bio/Technology* (9), S. 963-967.
- Lewandowski, I., & Kahnt, G.** (1993). Möglichkeiten zur Erstellung eines In-vitro-Vermehrungssystems für *Miscanthus "Giganteus"* durch Nutzung verschiedener Pflanzenteile als Spendergewebe. *Die Bodenkultur - Journal for Land Management, Food and Environment* (44). Abgerufen am 12. 02. 2011 von <http://www.boku.ac.at/10926.html>
- Lörz, H., Baker, B., & Schell, J.** (1985). Gene transfer to cereal cells mediated by protoplast transformation. *Mol. Gen. Genet.* (199), S. 178-182.
- Lotan, T., Ohto, M.-A., Yee, M., West, K., Lo, M. A., Kwong, R. et al.** (1998). *Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1* is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* (93), S. 1195-1205.
- Melzer, B.** (2009). Transformation von *Brachypodium distachyon* durch Agrobakterien-vermittelten Gentransfer in Sprossbasis-Segmente. Praktikumsarbeit, IPK-Gatersleben. HS-Mittweida
- Meneses, A., Flores, D., Munoz, M., Arrieta, G., & Espinoza, A. M.** (2005). Effect of 2,4-D, hydric stress and light on inidca rice (*oryza sativa*) somatic embryogenesis. *Re. Biol. Trop.*, (53), S. 361-368.

- Meyer, P.** (1995). Understanding and controlling transgene expression. *Trends in Biotechnology*, S. 332-337.
- Mockler, T. C.** (2010). *BRACHYPODIUM.ORG - The Brachypodium distachyon Information Resource - Home*. (Oregon State University) Abgerufen am 11. 03 2011 von <http://www.brachypodium.org/>
- Morrish, F., Vasil, V., & Vasil, I. K.** (1987). Developmental Morphogenesis and Genetic Manipulation in Tissue and Cell Cultures of the Gramineae. In J. G. Scandalios, & E. W. Caspari (Hrsg.), *Advance in Genetics* (24. Ausg.). Academic Press, Inc.
- Müller-Röber, B.** (2008). Grüne Gentechnologie: aktueller Stand und Perspektiven für die Zukunft. *J. Verbr. Lebensm.* (3), S. 41-46.
- Murashige, T.** (1974). Plant propagation through tissue. *Annual Review of Plant Physiology* (25), S. 135-166.
- Murashige, T., & Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Pl* (15), S. 473-497.
- Nabors, M. W.** (2007). *Botanik* (1. Ausg. S. 72-96). (M. Krieger-Hauwede, & K. Lippert, Übers.) München: Pearson Education Deutschland GmbH. ISBN 978-3-8273-7231
- Navarro-Alvares, W., Baenziger, P. S., Eskridge, K. M., Shelton, D. R., Gustafson, V. D., & Hugo, M.** (1994). Effect of shugars in wheat anther culture media. *Plant Breeding* (112), S. 53-62.
- Opanowicz, M., Vain, P., Draper, J., Parker, D., & Doonan, J.** (2008). *Brachypodium distachyon*: making hay with a wild gras. *Trends in Plant science* (13), S. 1360-1385.
- Păcurar, D., Thordal-Christensen, H., Nielsen, K., & Lenk, I.** (2008). A high-throughput *Agrobacterium*-mediated transformation system for the grass model species *Brachypodium distachyon* L. *Transgenic Res.* (17), S. 965-975.
- Purnhauser, L., & Gyulai, G.** (1993). Effect of copper on shoot and root regeneration in wheat, triticale, rape and tobacco tissue cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (35), S. 131-139.
- Reinert, J.** (1958). Untersuchungen über die Morphogenese an Gewebekulturen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* (71), S. 15.

- Sanford, J. C., Klein, T. M., Wolf, E. D., & Allen, N.** (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *J. Part. Sci. Tech.* (5), S. 27-37.
- Sidorov, V., Gilbertson, L., Addae, P., & Duncan, D.** (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of seedling-derived maize callus. *Plant Cell Rep.* (25), S. 320-328.
- Steward, F. C., Mapes, M. O., & Hears, K.** (1958). Growth and organized development of cultured cells. II. Growth and division of freely suspended cells. *Am. J. Bot.* (45), S. 705-708.
- Stone, S. L., Kwong, L. W., Yee, K. M., Pelletier, J., Lepiniec, L., Fischer, R. L. et al.** (2001). LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *PNAS* (98), S. 11806-11811.
- Thomas, T. L.** (1993). Gene expression during plant embryogenesis and germination: an overview. *Plant Cell* (5), S. 1401-1410.
- Thorpe, T. A., Stasolla, C., Yeung, E. C., de Klerk, G.J., Roberts, A., & George E. F.** (2008). The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems. In E. F. George, M. A. Hall, & G.-J. de Klerk, *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition* (3. Ausg., S. 115-137). Springer Verlag. ISBN 987-1-4020-5004-6
- Tingay, S., McElroy, D., & Kalla, R.** (1997). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *The Plant Journal* (11), S. 1369-1376.
- Travella, S., Ross, S. M., Harden, J., Everett, C., Snape, J. W., & Harwood, W. A.** (2004). A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. *Plant Cell Reports* (23), S. 780-789.
- Vain, P., Worland, B., Thole, V., McKenzie, N., Alves, S., Opanowicz, M. et al.** (2007). *Agrobacterium*-mediated transformation of the temperate grass *Brachypodium distachyon* (genotype Bd21) for T-DNA insertional mutagenesis. *Plant Biotech. J.* (6), S. 236-245.
- Villemont, E., Dubois, F., Sangwan, R. S., Vasseur, G., Bourgeois, Y., & Sangwan-Norreel, B. S.** (1997). Role of the host cell cycle in the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Petunia*: evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer. *Planta* (201), S. 160-172.

- Vogel, J., & Bragg, J.** (2009). *Brachypodium distachyon*, a New Model for the Triticeae. In *Genetics and Genomics of the Triticeae* (1. Ausg., Bd. 2, S. 427-449). Springer New York.
- Vogel, J., & Hill, T.** (2007). High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of the *Brachypodium distachyon* inbred line Bd21-3. *Plant Cell Rep* (27 (3)), S. 443-467.
- Vogel, J., D.F., G., Leong, O., & Hayden, D.** (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation and inbred line development in the model grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* (85), S. 199-211.
- von Arnold, S.** (2008). Somatic Embryogenesis. In E. F. George, M. A. Hall, & G.-J. de Klerk, *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition* (3. Edition Ausg., Bd. I, S. 335-354). Springer Verlag. ISBN 987-1-4020-5004-6
- Wagenitz, G.** (2003). *Wörterbuch der Botanik* (2. Ausg.). Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Wernicke, W., & Brettell, R.** (1980). Somatic embryogenesis from *Sorghum bicolor* leaves. *Nature* (287), S. 138-139.
- Wernicke, W., Brettell, R., Wakizuka, T., & Potrykus, I.** (1981). Adventitious embryoid and root formation from rice leaves. *Z. Pflanzenphysiol.* (103), S. 361-365.
- Wernicke, W., & Milkovits, L.** (1984). Developmental gradients in wheat leaves. Response of leaf segments in different genotypes cultured in vitro. *J. Plant Physiol.*, S. 49-58.
- Whatman.** (2009). *TurboBlotter*. Abgerufen am 14. 01. 2011 von Whatman Part of GE Healthcare: <http://www.whatman.com/turboblottter.aspx>
- Wojtaszek, P.** (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* (322), S. 681-692



## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Dr. Jochen Kumlehn, der mir erneut die Möglichkeit gegeben hat dieses interessante Thema zu bearbeiten und mir als Betreuer immer bei allen Fragen zu Theorie und Praxis zur Verfügung stand.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Röbbbe Wünschiers, der die Betreuung meiner Diplomarbeit von Seiten der Hochschule übernommen hat.

Einen großen Dank möchte ich ebenfalls Dr. Götz Hensel aussprechen, der mir die Theorie und Praxis der Klonierung lehrte und den Arbeitsplan für die Erzeugung des Binärplasmids erstellte.

Ich möchte mich auch bei meiner ehemaligen Betreuerin Dr. Carolin Berger sowie Dr. Ester Kapusi, Dr. Twan Rutten, Dr. Martin Giersberg und allen technischen Angestellten der Arbeitsgruppe PRB, insbesondere Cornelia Marthe und Erika Grützemann, für ihre tatkräftige Unterstützung beim Erlernen und Durchführen der Labortechniken sowie die gute Atmosphäre bei der Arbeit bedanken.

Ein großes Dankeschön sei auch Dr. Maia Gurushidze, Christine Kastner, Jan Riechen und Tilo Guse ausgesprochen, für die anregenden wissenschaftlichen und fachfremden Gespräche sowie ihre guten Ratschläge für das Anfertigen dieser Arbeit. Sie haben wesentlich zum Gelingen und Durchhalten des Schreibprozesses beigetragen.

Mein Dank gilt außerdem Jana Gutjahr und Doreen Babin, die mich bei Grammatik und Rechtschreibung unterstützt haben.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie für die finanzielle Unterstützung, ihren Rückhalt und ihr Verständnis bedanken. Sowie bei meinem Freund Jack Gutjahr der außerordentliche Geduld bewiesen hat und es schaffte mich immer aufs Neue zu motivieren.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Quellen die wörtlich oder inhaltlich in diese Arbeit eingeflossen sind wurden an der entsprechenden Stelle im Text gekennzeichnet und sind im Literaturverzeichnis aufgeführt.

Gatersleben, den 28.04.2011

Bearbeitungsort, Datum

Unterschrift